

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**“EL GEN SUPRESOR DE TUMORES DE VON HIPPEL-LINDAU  
REGULA LA FORMACIÓN DE UNIONES INTERCELULARES  
Y EL ENSAMBLAJE DE LA MATRIZ EXTRACELULAR DE  
FIBRONECTINA EN CÉLULAS DE CARCINOMA RENAL  
HUMANO.”**

TESIS DOCTORAL

**MÓNICA FEIJÓO CUARESMA**

MADRID, 2009



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**“EL GEN SUPRESOR DE TUMORES DE VON HIPPEL-LINDAU  
REGULA LA FORMACIÓN DE UNIONES INTERCELULARES  
Y EL ENSAMBLAJE DE LA MATRIZ EXTRACELULAR DE  
FIBRONECTINA EN CÉLULAS DE CARCINOMA RENAL  
HUMANO”**

TESIS DOCTORAL presentada por

**MÓNICA FEIJÓO CUARESMA**

Licenciada en Ciencias Biológicas,

Para optar al grado de Doctor.

Directores: **Dra. MARÍA JOSÉ CALZADA**

**Dr. MANUEL ORTIZ DE LANDÁZURI**

Universidad Autónoma de Madrid

Servicio de Inmunología. Hospital Universitario de la Princesa.



Dña. Mónica Feijóo Cuaresma ha desarrollado bajo nuestra dirección el trabajo titulado: “El gen supresor de tumores de von Hippel-Lindau regula la formación de uniones intercelulares y el ensamblaje de la matriz extracelular de fibronectina en células de carcinoma renal humano” en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Por sus aportaciones a congresos y publicaciones, así como por su interés actual, estimo este trabajo merecedor de ser aceptado como TESIS DOCTORAL en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

En Madrid, a 25 de Mayo de 2009

Dra. Maria José Calzada.  
Ramón y Cajal U.A.M.

Dr. Manuel Ortiz de Landázuri.  
Catedrático de Inmunología de la UAM.

Vº Bueno del Tutor

Miguel Quintanilla  
Profesor Honorario Dpto Bioquímica U.A.M



*A mis padres y hermanas*





## ***AGRADECIMIENTOS***



Este es el apartado más difícil de escribir para mí, porque por mucho que pueda decir no reflejará ni la mitad de lo agradecida que estoy a tantas personas... He tenido la suerte de rodearme de gente que me ha facilitado mucho mi desarrollo tanto profesional como personal.

Me gustaría empezar dándole las gracias a Manuel Ortiz de Landázuri por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo en el Hospital Universitario de la Princesa. También me gustaría agradecer a María José Calzada los momentos de “gloria” y el sobrellevar los de “pena” que hemos vivido en los últimos 4 años...

Tengo un agradecimiento muy especial para Luis Álvarez Vallina, me enseñaste que esto no era un camino fácil... gracias por tu franqueza. A Laura Sanz le agradezco que me enseñara a trabajar en ciencia, porque no sólo aprendí a hacer “elisas” sino a interesarme por esto. Y en ese momento de mi vida no hubiera aprendido todo esto si no me hubieran apoyado mis 4 “chicos preferidos de la ciencia”; Carlos, Víctor, Javi y Juan, muchísimas gracias por todo lo compartido y por vuestro cariño infinito. Hay mucha gente que ese verano formó parte de esto en el Hospital Puerta de Hierro y a todos vosotros os doy las gracias.

Después entre en la Princesa y me encontré con gente que luego formaría parte muy importante de mi vida. Al primero que me gustaría mencionar es a Salva, tengo que agradecerte todas las cosas que aprendí de ti en el laboratorio, como por ejemplo los clonajes (no me han vuelto a salir a la primera desde que te fuiste...) y todo lo que me cuidaste durante mis estancias en Washington, hiciste que fuera una experiencia inolvidable. También me gustaría agradecer el cariño de Elisa, gracias por haberte convertido en amiga, porque hay momentos que me ha encantado compartir contigo. A mi Nurita bonita, porque siempre tienes una sonrisa para mí, lo cual se agradece mucho en los momentos más difíciles y porque no ha habido ni una sola vez en la que haya necesitado tu apoyo y no me lo hayas dado, eres muy importante en mi vida. A mi Marnie, gracias infinitas por tener siempre tiempo para discutir de ciencia, escuchar divagaciones a altas horas de la tarde y ser capaz de hacerme desconectar con unas cañitas... A mi Alicita, porque eres uno de mis grandes apoyos en el labo, ha habido muchos cambios que han sido difíciles pero nosotras hemos sido una constante, gracias por estar a mi lado porque te necesito. Aquí aprovecho para agradecer también a Mariano, Laura y David su viaje a Washington, fue genial. Y muchísimas gracias a toda la gente que ya no está en el laboratorio y de la que, sin duda, he aprendido cosas como Silvia y Maika.

Y para seguir con mi grupo... me gustaría agradecerte Ángel que, a pesar de que podíamos habernos convertido en compañeros, no lo hemos hecho y para mí eres un gran amigo que no pienso cambiar por nada. A Ainara, que sacas mi lado más tierno, gracias por escucharme cada vez que lo he necesitado. A Alfonso el darme siempre tu punto de vista (que no suele coincidir con el mío...) y creo que eso enriquece mucho, gracias!. A Esther y Juan Luis su optimismo y el interés que habéis demostrado por mí aún estando a miles de kilómetros de aquí. Bárbara, comenzamos juntas y terminamos juntas...gracias por tu ayuda desinteresada a todo el mundo y en especial gracias por demostrarme que estás a mi lado. Kostas, gracias por meterme tanta caña, eso ha sido imprescindible para que ahora esté lista para leer esta tesis, sé que todo lo que me dices es por mi bien y me alegro muchísimo de que en mi vida haya gente como tú. Mil gracias también a Laura y mi grupo preferido del Ramón y Cajal, David, Nacho y mi Eli, cómo me ha gustado trabajar con vosotros y cómo os agradezco las diez mil conversaciones de ciencia y de no ciencia... gracias por haberos convertido en amigos y Laura, gracias por escucharme y orientarme en varias ocasiones, lo valoro mucho.

A Silvia le agradezco su sonrisa y disponibilidad cada vez que he necesitado algo... me impresiona tu interés científico y creo que vales un montón, ten por seguro que conseguirás todo lo que te propongas. A Inés... tu desparpajo y el aire fresco que has traído al labo...eres super rica!. A Julián... te daría las gracias por varias cosas pero creo que puedo resumirlo en gracias por contagiarme tu entusiasmo por la ciencia, me ha llenado de energía positiva, mil gracias!.

A mi Glory... para ti si que no tengo palabras... gracias por respirar profundo en alguna ocasión en lugar de meterme dos gritos, por comprenderme desde el principio sin apenas conocerme y por haberme abierto tu corazoncito... A Raquel, gracias por tu preocupación continua por los demás y por tener siempre tiempo para escuchar, gracias por tu humanidad. Chicas, ha sido un placer trabajar con vosotras!

También quiero agradecerles a Daniel, Edu, Gemma, María, Susana y Toño, así como al resto de mis compañeros, la paciencia que habéis tenido conmigo en estos meses... Os deseo lo mejor del mundo.

Tuve la suerte de compartir inicio en el departamento con dos personas que para mí son geniales; Arantxa, gracias por tus carcajadas, tu ilusión y tu perseverancia...me has enseñado mucho... y Amalia, te agradezco sentirte tan cerquita tanto ahora como en millones de ocasiones, gracias por confiar en mí más que yo misma y transmitírmelo. Y no

olvidaré que durante un tiempo fuimos...”las super nenas” qué grande. También agradecerle a Javilón esos viajes y confianzas...qué tiempos!.

También me gustaría dar las gracias a los Pacos, especialmente a Manolo Gómez, gracias por tratarme con tanto cariño y debatir conmigo sobre la “vida científica”, tu opinión es muy importante para mí. A Esteban por preocuparte tanto por mí. A Román por su “arte”, a las Mónicas por estar siempre que lo he necesitado...A Hortensia, Mimo, Marta, Carmen, Ursa, Mittel, Olga, Fran y Noa porque de alguna manera u otra cada uno de vosotros me habéis aportado algo durante este tiempo.

Y cómo no agradecer a la gente del IIB... especialmente a Luis del Peso y su grupo, por su apoyo durante el tiempo que compartimos en la Princesa pero sobre todo porque, a pesar del cambio de labo, nunca os he sentido lejos. A Marisa, Diego, José, Bea, Asun... al 1.4.1 y 1.4.2 por hacerme sentir como en casa.

También agradecerle al grupo de David D. Roberts la gran acogida en los 7 meses que estuve en Washington, a Jeff esas isquemias, a Gema y a Juanma por llevarme a IKEA y hacer siempre lo imposible porque estuviera como en casa, a Mike por cada una de las sonrisas que me sacó, a Tom por su infinita paciencia con mi inglés y por no desistir por el idioma... porque es gracias a eso por lo que ahora somos buenos amigos. A Lizz, Dammika, Justin... y a todos los que facilitasteis mucho mi estancia allí. Y no me olvido de mi Nata... mil gracias por ser, sin lugar a dudas, lo mejor de mi segunda estancia...

A mis amigos de la facultad; A Lara porque me ha encantado que empezáramos juntas en Puerta de Hierro (qué verano!) y tener la oportunidad de volver a trabajar contigo en la Princesa... porque me gusta mucho compartir mi vida contigo sobre todo porque me resulta muy fácil porque sabes muy bien por donde respiro... A María, por nuestros “gabinetes de crisis”, porque cuando “involuciono” y no hay quien me saque de mi burbuja, eres de las pocas personas que tienen paso y que consigue sacarme del colapso, gracias por quererme tanto y por hacer que te quiera con locura. A Mentxulina, Alai, Silvia, Alex, Pablo Mancheño, Laura, Pablo Saez, Jortxi, Guada, Anita, Irene, Carlos, por estar siempre pendientes de mi y compartir mis buenos y malos momentos.

A mis amigos del barrio, en especial a Rocío, David, Ori, Eloy e Isa por intentar comprender mi “mundillo” que sé que no es fácil y apoyarme a pesar de no compartir a veces mis decisiones. A mi Edudu, porque me gusta mucho cómo te interesa hablar conmigo de tus nanopartículas y cómo te ilusionan nuestras conversaciones... pero sobre todo por cómo haces que eso me ilumine la mirada. Y a Chino, porque estando en el

hospital escuchó 5 veces seguidas mi charla del DEA y porque estoy segura de que, si pudiera, escucharía mil veces la de la tesis. Porque mi vida no será la misma sin ti, aprendí tantas cosas contigo... y me faltaban tantas otras...

Para terminar me gustaría darles las gracias a las personas más importantes de mi vida, mis padres, muchísimas gracias por vuestro apoyo incondicional, por confiar en que, paso tras paso, iba a encontrar mi camino... por haberme convertido en la persona que soy y por que sé que siempre vas a estar a mi lado, os quiero muchísimo. Y por supuesto a mis hermanas, Sonia y Virginia, porque sin vosotras yo sería, sin duda, otra persona... y sois la debilidad de mi vida... os quiero infinito.

## ***RESUMEN***

---





La inactivación del gen supresor de tumores de von Hippel-Lindau (*vhl*) es responsable del desarrollo de cánceres renales de célula clara (RCC), feocromocitomas y tumores en otros órganos. Aunque la función más conocida de la proteína VHL es marcar al factor inducible por hipoxia (HIF) para su degradación vía proteosoma, VHL también parece jugar un papel en el establecimiento del fenotipo epitelial en células RCC. Sin embargo el mecanismo para esta regulación, así como la implicación de HIF en este proceso siguen sin estar claros. La ausencia de uniones intercelulares induce un fenotipo fibroblástico en múltiples modelos de cáncer, por ello nos planteamos la hipótesis de que la expresión de VHL podría estar implicada en la formación de uniones intercelulares en células RCC. Nuestros experimentos han demostrado que VHL es necesaria para la organización adecuada de uniones de tipo adherente y ocluyente, así como para el mantenimiento de la polaridad y el control de la permeabilidad en estas células. Sin embargo la expresión de formas mutadas de VHL capaces de regular la expresión de HIF o la expresión de formas mutadas de HIF resistentes a degradación no inducían cambios en el fenotipo de estas células. Por tanto, nuestros resultados indican que la inactivación de VHL en células RCC provoca la desestabilización de uniones intercelulares induciendo cambios en su morfología, siendo este un efecto independiente de la regulación de HIF.

Además, la inactivación de este gen se ha asociado con un defecto en el ensamblaje de fibronectina, cuya pérdida promueve y mantiene la angiogénesis tumoral permitiendo la infiltración de los vasos en el tumor. Sin embargo no están claros los mecanismos implicados así como el papel de pVHL en dicha regulación. Teniendo en cuenta la importancia de este proceso en el crecimiento tumoral, consideramos de gran interés estudiar el papel de VHL en este proceso. Nuestros resultados mostraron que la incapacidad de ensamblar fibronectina por las células VHL negativas no era debida a los niveles secretados ni a la funcionalidad de la misma. Sin embargo encontramos que en células VHL negativas la activación de la GTPasa RhoA era deficiente debido a un aumento en la activación de p190RhoGAP, uno de sus inhibidores. Además, la expresión de una forma constitutivamente activa de RhoA era capaz de revertir parcialmente el ensamblaje de fibronectina en las células VHL negativas, sugiriendo así la importancia de RhoA en el desarrollo de estos carcinomas.



## ***ABSTRACT***

---



Inactivation of the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene is responsible for the development of renal cell cancers (RCC), pheochromocytomas, and tumors in other organs. The best known function of VHL protein (VHL) is to target the hypoxia-inducible factor (HIF) for proteasome degradation, although other VHL functions are required for the establishment of an epithelial-like cell shape in otherwise fibroblastic-like RCC cell lines. However, the underlying mechanisms and whether this is linked to HIF remain undetermined. Because the breakage of intercellular junctions induces a fibroblastic-like phenotype in multiple cancer cell models, we hypothesized that VHL may be required for the assembly of intercellular junctions in RCC cells. Our results showed that VHL in RCC cell lines was necessary for the normal organization of adherens and tight intercellular junctions, the maintenance of cell polarity, and control of paracellular permeability. Additionally, stable transfection of certain pVHL mutant forms that were able to restore the regulation of HIF or transfection of a constitutively active form of HIF2 $\alpha$  that lacks pVHL binding sites, did not induce any phenotypic changes in these cells. Therefore, our results indicated that VHL inactivation in RCC cells disrupts intercellular junctions and cell shape through HIF-independent events. In addition, VHL inactivation has been also associated with a major defect in extracellular fibronectin assembly, although the underlying mechanisms as well as whether VHL might be regulating this process is unknown.

On the other hand, the lack of fibronectin matrix assembly is thought to promote and maintain tumor angiogenesis allowing vessels to infiltrate tumors. Therefore, and considering the importance of this process in tumor growth, we aimed to study why VHL (-) renal cancer cells fail to form a proper extracellular matrix. Our results showed that VHL (-) cells were not defective in fibronectin production and that the fibronectin produced by these cells was equally functional in promoting cell adhesion and matrix assembly as that produced by VHL (+) cells. Instead we found that activation of the RhoA GTPase was defective in VHL (-) cells, and this was possibly mediated by an increased activation of its inhibitor, p190RhoGAP. Additionally, the expression of constitutively active RhoA in VHL (-) cells resulted in formation of a fibronectin matrix. These results strongly suggest that RhoA has an important role in the development of renal cell carcinomas.



## ***ÍNDICE***

---





<b>Agradecimientos</b>	<b>III</b>
<b>Resumen</b>	<b>IX</b>
<b>Abstract</b>	<b>XIII</b>
<b>Índice</b>	<b>3</b>
<b>Clave de Abreviaturas</b>	<b>9</b>
<b>Introducción</b>	<b>13</b>
<b>1. El gen supresor de tumores <i>vhl</i></b>	<b>13</b>
1.1. El síndrome de von Hippel-Lindau	13
1.2. VHL: Función	17
1.2.1. Regulación de HIF.	18
1.2.2. Funciones independientes de HIF.	20
<b>2. Uniones intercelulares</b>	<b>23</b>
2.1. Adhesión célula-célula	23
2.2. Adhesión célula-matriz extracelular.	25
<b>3. Ensamblaje de fibronectina.</b>	<b>26</b>
3.1. Regulación del proceso de ensamblaje de fibronectina.	29
<b>Objetivos</b>	<b>33</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>37</b>
1. Células y reactivos	37
2. Inmunodetección mediante microscopía de fluorescencia	38
3. Inmunodetección de proteínas mediante Western blot.	40
4. Fraccionamiento del material soluble e insoluble.	40
5. Medida de la permeabilidad celular.	41
6. PCR cuantitativa a tiempo real.	41
7. Transducción celular mediante infección retroviral.	42
8. Purificación de la fibronectina secretada por las células VHL (+) y VHL (-).	43
9. Ensayos de adhesión celular.	44
10. Ensayos de actividad de RhoA.	44
11. Análisis de la fosforilación de p190RhoGAP	45
12. Silenciamiento mediante siRNA.	45
13. Análisis estadístico de los datos.	46

<b>Resultados</b>	<b>49</b>
<b>1. VHL es necesario para la correcta formación de uniones intercelulares en células de carcinoma renal humano (RCCs).</b>	<b>49</b>
1.1. Papel de VHL en la formación de uniones intercelulares en células RCC.	49
1.2. La inactivación de VHL en células RCC interrumpe la asociación de ZO-1 con el citoesqueleto de actina y aumenta la permeabilidad paracelular.	53
1.3. La adquisición de morfología fibroblástica y la rotura de uniones intercelulares en células RCC VHL negativas es independiente de la expresión de HIF $\alpha$ .	56
1.4. El bloqueo de la formación de matriz de fibronectina no altera la citoarquitectura epitelial en células 786-O transfectadas con VHL salvaje.	62
<b>2. VHL es necesario para la correcta formación de matriz de FN en células de carcinoma renal humano (RCCs).</b>	<b>64</b>
2.1. Los niveles de expresión de FN en células de carcinoma renal y en sus revertientes transfectadas con VHL no se correlacionan con la capacidad de estas células para ensamblar una matriz de FN.	64
2.2. La Fibronectina producida por las células VHL (-) es funcional y capaz de ensamblarse en fibras para formar una matriz.	68
2.3. Las células VHL (-) son deficientes en la formación de fibras de estrés y en la contractibilidad celular.	71
2.4. La activación de la GTPasa RhoA es deficiente en células VHL (-).	73
2.5. La activación constitutiva de RhoA estimula el ensamblaje de fibronectina en células VHL (-).	77
2.6. La disminución de la actividad de RhoA en células VHL (-) correlaciona con un aumento en la fosforilación de p190RhoGAP.	80
2.7. El silenciamiento de p190RhoGAP en células VHL (-) reestablece parcialmente su capacidad para ensamblar fibronectina.	81
2.8. La hipoxia afecta la formación de matriz de fibronectina en células VHL (+).	83
2.9. La pérdida de ensamblaje de FN en las células VHL (-) es independiente de HIF2 $\alpha$ .	85
2.10. Inhibidores de las metaloproteinasas revierten la pérdida de ensamblaje de FN en las células VHL (+) en condiciones de hipoxia.	86
2.11. Inhibidores de las PKCs no tienen efecto en el de ensamblaje de FN en las células 786-O.	87
<b>Discusión</b>	<b>91</b>

<b>Conclusiones</b>	<b>101</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>105</b>
<b>Anexo I</b>	<b>117</b>
<b>Anexo II</b>	<b>121</b>



## ***ABREVIATURAS***



**ARNT:** *Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*, Translocador nuclear del receptor para aril hidrocarburos.

**bHLH:** *Basic-Helix-Loop-Helix*, Motivo estructural de interacción proteína-proteína y proteína-ADN formado por un dominio básico seguido de hélice-bucle-hélice.

**BSA:** *Bovine Serum Albumin*, Albúmina de suero bovino.

**EMT:** *Epithelial-Mesenchymal Transition*, Transición Epitelio-Mesénquima

**FAK:** *Focal Adhesion Kinase*, Kinasa de adhesión focal.

**FIH:** *Factor Inhibiting HIF-1*, Factor inhibidor de HIF-1.

**FN:** *Fibronectin*, Fibronectina.

**GAP:** *GTPase Activating Protein*, proteína activadora de GTPasa.

**GEF:** *guanine nucleotide exchange factors*, Factor de intercambio de nucleótido de guanina.

**GDI:** *GDP-Dissociation Inhibitor*, Inhibidor de disociación de GDP.

**GTPasa:** *Guanosine Triphosphate Hydrolase*, Hidrolasa de guanosina trifosfato.

**HIF:** *Hypoxia-inducible factor*, Factor inducible por hipoxia.

**HRE:** *Hypoxia Response Element*, Elemento de respuesta a Hipoxia.

**ILK:** *Integrin linked kinase*, Kinasa ligada a integrina.

**IRES:** *Internal Ribosome Entry Site*, Sitio interno de entrada del ribosoma.

**LPA:** *Lysophosphatidic acid*, Ácido lisofosfatídico.

**MMP:** *Matrix Metalloproteinase*, Metaloproteasa de matriz.

**NFkB:** *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, Activador de la cadena ligera del Factor nuclear kappa de células B activadas

**PHD:** *Prolyl hydroxylase domain containing protein*, Proteína que contiene un dominio prolina hidroxilasa.

**PKC:** *Protein Kinase C*, Proteína Kinasa C.

**RCC:** *Renal cancer cells*, células de cáncer renal.

**siRNA:** *Small Interference RNA*, RNA de interferencia pequeño

**VEGF:** *Vascular Endothelial Growth Factor*, Factor de crecimiento del endotelio vascular.

**VHL:** *von Hippel-Lindau protein*, Proteína codificada por el gen supresor de tumores causante del síndrome de von Hippel Lindau.





## ***INTRODUCCIÓN***



## **1. EL GEN SUPRESOR DE TUMORES *vhl*.**

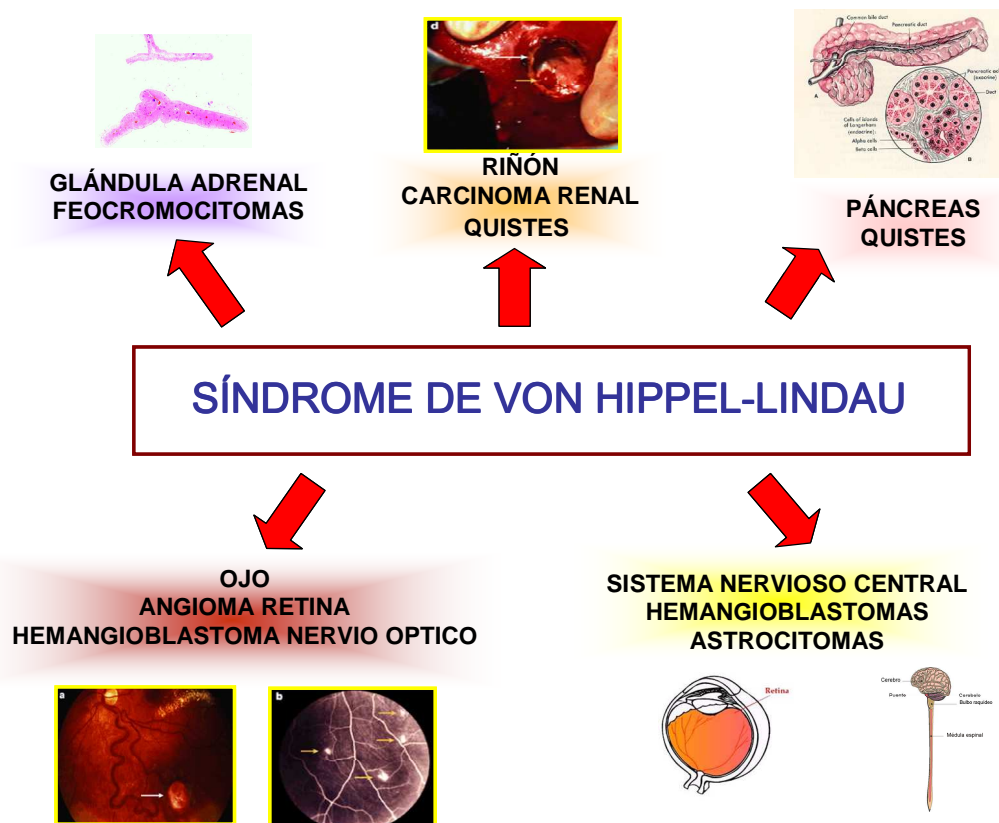
### **1.1. EL SÍNDROME DE VON-HIPPEL LINDAU.**

La mutación o pérdida del gen supresor de tumores de von Hippel-Lindau (*vhl*) en células de la línea germinal origina la enfermedad de von Hippel-Lindau, un raro síndrome multitumoral (1/40.000 individuos) caracterizado por el desarrollo de multitud de tumores benignos y malignos en diferentes órganos (Kaelin 2002; Kondo, Kim et al. 2003). Entre sus manifestaciones cabe destacar el desarrollo de múltiples tumores vasculares denominados hemangioblastomas, principalmente del sistema nervioso central (normalmente en el cerebelo) y de la retina, quistes en múltiples localizaciones, feocromocitomas y carcinomas renales de célula clara (RCC). Los quistes son especialmente frecuentes en el riñón y, si bien en su origen son benignos, pueden llegar a invadir el órgano, malignizarse y afectar así su función. Los feocromocitomas son tumores neuroendocrinos de la glándula suprarrenal (derivan de células de la cresta neural), y cursan con graves crisis hipertensivas. VHL también está desactivado en más de un 80% de los carcinomas renales esporádicos de célula clara (la forma más frecuente de la malignidad renal) (Kaelin 2002). En ratones inmunodeficientes el efecto tumorogénico de líneas celulares de carcinomas renal de célula clara se revierte cuando se reexpresa VHL en las mismas (Iliopoulos, Kibel et al. 1995; Gnarr, Duan et al. 1996; Schoenfeld, Davidowitz et al. 1998). Esto indica que la inactivación de VHL es responsable del desarrollo de RCC más que ser una alteración casual.

El adenocarcinoma renal, también denominado nefroepitelioma, tumor de Grawitz, hipernefoma o carcinoma renal de célula clara, representa aproximadamente el 2% de la totalidad de los tumores en el adulto, constituyendo el 90% de los tumores de riñón. Se presenta con más frecuencia en el hombre que en la mujer (2:1), y es patrimonio casi exclusivo del adulto (individuos mayores de 40 años), siendo poco común en niños. La sexta y séptima década de la vida representa la edad de mayor incidencia de este tumor. Frecuentemente, entre el 50-80% de los enfermos presentan metástasis en el momento del diagnóstico, siendo su localización más frecuente en pulmón, hueso, hígado, cerebro, suprarrenal y riñón contra lateral. En cuanto a su tratamiento, la cirugía es la única opción

curativa para estos cánceres renales, ya que responden muy mal a quimioterapia y radioterapia

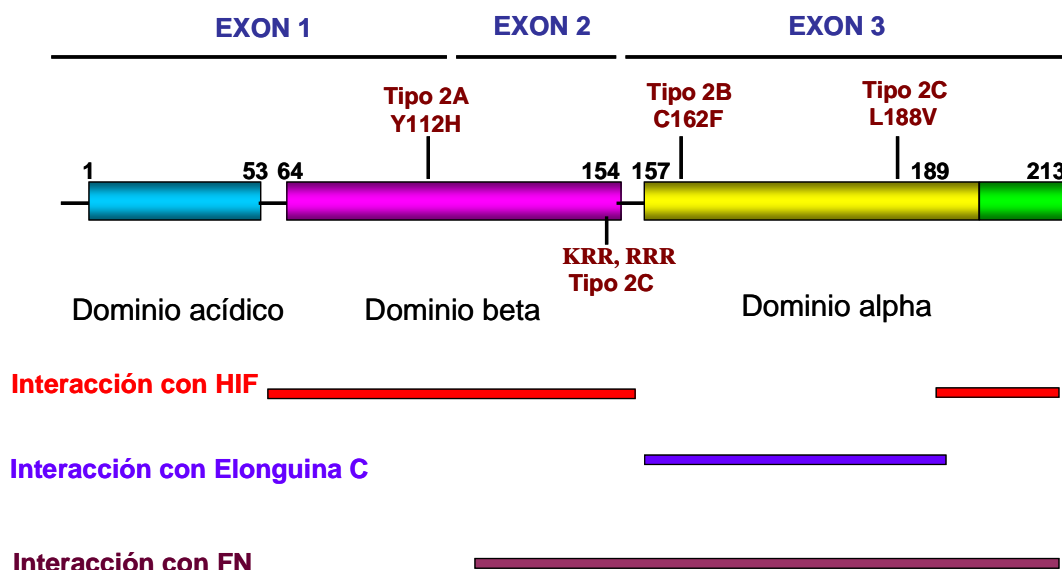
La nomenclatura de los carcinomas renales de célula clara viene dada por el aspecto blanquecino del citoplasma de sus células (debido a la acumulación de lípidos y glucógeno). Es frecuente su extensión local a la vena cava y tejidos adyacentes, aunque también a tejidos distantes, en particular a los huesos. Estos carcinomas renales son una causa frecuente de muerte en pacientes con el síndrome de VHL, debido generalmente, a insuficiencia renal aguda, o a las consecuencias de la insuficiencia renal crónica. Otras manifestaciones menos frecuentes de la enfermedad de von Hippel-Lindau son los quistes de hígado, saco endolinfático (en el oído interno), pulmón, bazo o hueso, y los adenomas de la glándula pituitaria (Kaelin 2002) (Figura 1).



**Figura 1. Principales órganos afectados en el síndrome de von Hippel-Lindau.** Es un síndrome tumoral hereditario causado por la mutación de la proteína VHL en línea germinal. La manifestación clínica es debida a la pérdida o inactivación del alelo normal. La prevalencia es de 1/40.000. Las manifestaciones más comunes son múltiples tumores vasculares denominados hemangioblastomas principalmente del sistema

nervioso central (normalmente en el cerebelo) y de la retina, quistes en múltiples localizaciones, feocromocitomas y cánceres renales de célula clara (RCC).

La enfermedad presenta herencia autosómica recesiva, manifestándose únicamente cuando el segundo alelo del gen también se muta. En función de la aparición o no de sus tres manifestaciones más características (feocromocitomas, cánceres renales y hemangioblastomas) se subdivide en cuatro grupos sindrómicos denominados I, 2A, 2B y 2C. El tipo I es el más frecuente, representa en torno al 80% de los casos (Kaelin 2002) y se caracteriza por la aparición de hemangioblastomas y cánceres renales, pero no por la aparición de feocromocitomas. La base molecular de este subtipo I se debe a la existencia de delecciones groseras de la proteína VHL, y como consecuencia de esto, VHL no es capaz de regular al factor inducible por hipoxia (HIF) y éste se acumula (ver VHL: Función). Además líneas celulares generadas mediante transfección estable con las diferentes delecciones de VHL en células 786-O VHL negativas (DE-2B, DE-2D y DE-7) no son capaces de formar una adecuada matriz de fibronectina (FN). En el tipo II son mutaciones de determinados residuos de VHL las que condicionan la clínica de la enfermedad. El tipo 2A se caracteriza por la aparición de feocromocitomas y hemangioblastomas pero tienen bajo riesgo de aparición de cáncer renal. El tipo 2B conlleva alto riesgo de las tres manifestaciones y el tipo 2C desarrolla exclusivamente feocromocitomas. Tanto células que expresan mutaciones de VHL caracterizadas en la enfermedad de tipo 2A (Y112H) como de tipo 2B (C162F) acumulan HIF y no son capaces de ensamblar FN. Sin embargo, células que expresan VHL con mutaciones que corresponden a la enfermedad de tipo 2C (L188V, RRR) son capaces de regular HIF y aún así no son capaces de ensamblar una matriz de FN adecuada. Hace no mucho se describió otro grupo sindrómico, el tipo III, que corresponde al síndrome de Chuvash, un tipo muy raro de policitemia hereditaria (Ang, Chen et al. 2002). Estos pacientes desarrollan hemangioblastomas benignos en el sistema nervioso central, pero no las otras manifestaciones clásicas de la enfermedad (Figura 2 y Tabla 1). Claramente todo ello sugiere una segregación de funciones en los distintos dominios de la proteína VHL. Aparte de la naturaleza propia de los hemangioblastomas, una circunstancia común a todos estos tumores es su abundante vascularización (Ang, Chen et al. 2002). Esta elevada vascularización podría estar relacionada con la aparición de carcinomas esporádicos de colon, esófago o páncreas, siendo más bien una alteración asociada al carcinoma primario y no la desencadenante en sí de todo el proceso tumoral.



**Figura 2. Estructura del gen de *vhl* y localización de los mutantes de *vhl*.** El gen de *vhl* se ha localizado en el cromosoma 3 (3p25). En su estructura posee un dominio N-terminal ácido comprendido entre el aminoácido 1 y 53, un dominio beta comprendido entre el 64 y el 154 y un dominio alpha que incluye la secuencia de los aminoácidos del 157 al 213. El dominio beta y la última parte del dominio alpha contienen las secuencias de interacción con HIF. El dominio alpha incluye además secuencias de interacción con la Elonguina C, la cual hace de puente con el resto de proteínas que forman parte del complejo E3 ubiquitin ligasa. Los mutantes de tipo 2A tienen la mutación en el dominio beta y los mutantes de tipo 2B y 2C en el dominio alpha a excepción del mutante RRR que tiene la mutación en el dominio beta. El gen codifica para dos proteínas con distinto peso molecular (25 y 19 kDa) debido a la existencia de dos sitios de inicio de la transcripción distintos. A pesar de estas diferencias ambas proteínas son completamente funcionales.

<b>TIPO DE ENFERMEDAD VHL</b>	<b>TIPO DE MUTACIÓN</b>	<b>DEFECTO MOLECULAR</b>	<b>MANIFESTACIÓN CLÍNICA</b>
<b>Tipo I</b> 80% DE-2B DE-2D DE-7	Pérdida de VHL Mutaciones que afectan a la integridad de la proteína	Acumulación de HIF y pérdida de ensamblaje de FN	Hemangioblastomas Carcinomas renales de célula clara.
<b>Tipo 2A</b> Y112H	Mutación puntual sin sentido en VHL	Acumulación de HIF y pérdida de ensamblaje de FN	Hemangioblastomas Feocromocitomas
<b>Tipo 2B</b> C162F	Mutación puntual sin sentido en VHL	Acumulación de HIF y pérdida de ensamblaje de FN	Hemangioblastomas Feocromocitoma Carcinomas renales de célula clara.
<b>Tipo 2C</b> L188V RRR	Mutación puntual sin sentido en VHL	Regulación de HIF Disminuye la interacción VHL-FN y pérdida de ensamblaje de FN	Feocromocitoma
<b>Tipo III</b>	Mutación puntual sin sentido en VHL R200W	Acumulación de HIF	Síndrome de Chuvash. (Hemangioblastomas Polycitemia)

**Tabla1. Clasificación de los distintos subtipos de la enfermedad provocados por la pérdida de función de VHL.** Se clasifican según la aparición o no de sus tres manifestaciones más características (feocromocitomas, carcinomas renales y hemangioblastomas). Además en la tabla se representa el tipo de mutación y el defecto molecular que ello conlleva en cada uno de los subtipos de la enfermedad.

## 1.2. VHL: FUNCIÓN.

El desarrollo de tumores en la enfermedad de VHL está unido a la inactivación somática o la pérdida del alelo normal de *vhl* remanente. En modelos animales se ha probado que el restaurar la función de la proteína VHL es suficiente para reprimir la formación de carcinomas renales *in vivo* (Iliopoulos, Kibel et al. 1995; Gnarr, Duan et al. 1996; Schoenfeld, Davidowitz et al. 1998).

### 1.2.1. REGULACION DE HIF.

La función más conocida de la proteína VHL es formar parte de un complejo E3-ubiquitin ligasa que reconoce la subunidad  $\alpha$  del factor inducible por hipoxia (HIF- $\alpha$ ) lo ubiquitina y lo marca para su degradación por el proteosoma (Maxwell, Wiesener et al. 1999; Cockman, Masson et al. 2000; Tanimoto, Makino et al. 2000; Barry and Krek 2004). La base molecular del reconocimiento y degradación de HIF- $\alpha$  por VHL es la hidroxilación de HIF $\alpha$  por una familia de proteínas dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato, hierro y oxígeno, denominadas PHDs (proteínas que contienen un dominio prolil-hidroxilasa) (Bruick and McKnight 2001). Los residuos de hidroxilación son residuos específicos de prolina (Pro402 y Pro564 en HIF-1; Pro405 y Pro531 en HIF-2) (Jaakkola, Mole et al. 2001; Masson, Willam et al. 2001). En condiciones de hipoxia las PHDs, que son dependientes de oxígeno, están inactivas y por tanto son incapaces de hidroxilar HIF $\alpha$  y éste escapa a la ubiquitinación mediada por el complejo E3-ubiquitinligasa-VHL y por tanto a su degradación por el proteosoma. Esto mismo ocurre en células VHL negativas (Maxwell, Wiesener et al. 1999). Por tanto en estas condiciones HIF $\alpha$  se estabiliza, se acumula y se transloca al núcleo para unirse a su subunidad  $\beta$  (HIF $\beta$  o ARNT) y se promueve la transcripción de sus genes diana (Semenza 2003). Muchos de estos genes están implicados en tumorigénesis, entre ellos se encuentra incluido el factor angiogénico VEGF (Maher and Kaelin 1997). Aunque la regulación de este gen explicaría la alta vascularización de los tumores negativos para la expresión de VHL, no queda claro cómo la pérdida de esta proteína provoca cáncer renal.

Estudios previos usando células VHL positivas y negativas revelan pautas de inducción de genes HIF-dependientes y HIF-independientes que podrían estar implicados o participar en la aparición de la enfermedad (Hu, Wang et al. 2003). Además, la inactivación de HIF2 $\alpha$  en células VHL negativas mediante RNA de interferencia o la sobreexpresión de una forma de HIF-2 $\alpha$  constitutivamente activa (que tiene sustituidas dos prolinas esenciales para el reconocimiento de VHL) en células RCC que expresan VHL de forma estable, ha establecido claramente una conexión directa entre HIF2 $\alpha$  y la formación de tumores de RCC (Kondo, Klco et al. 2002; Kondo, Kim et al. 2003; Zimmer, Doucette et al. 2004). Por otro lado, se ha visto que defectos en un tipo específico de modificación



covalente, llamada nedilación, en VHL, anulan el efecto supresor de tumores de la proteína VHL en líneas de célula de RCC , a pesar de conservar su capacidad de regular HIF correctamente (Stickle, Chung et al. 2004). Otras mutaciones en el dominio ácido COOH-terminal de VHL también se comportan de forma similar (Lolkema, Gervais et al. 2005).

Además es interesante destacar que la estabilización de HIF2 $\alpha$  pero no de HIF-1 $\alpha$  (Maranchie, Vasselli et al. 2002) es necesaria para la formación de tumores VHL-deficientes y que la inhibición de HIF2 $\alpha$  es suficiente para que VHL actúe como supresor de tumores (Brugarolas, Vazquez et al. 2003; Kondo, Kim et al. 2003). Así células de carcinoma renal de célula clara, VHL negativas, que sobreexpresan HIF2 $\alpha$  producen tumores en ratones. En cambio, al reintroducir la proteína VHL haciendo que disminuya HIF2 $\alpha$  en estas células, el crecimiento celular *in vitro* parece no estar afectado, aunque estos resultados son controvertidos porque otros autores demuestran que HIF2 $\alpha$  promueve proliferación *in vitro* (Gordan, Bertout et al. 2007). Pero lo que sí parece claro es su capacidad de generar tumores *in vivo*, indicando que la sobreexpresión de HIF2 $\alpha$  es necesaria para la tumorigenicidad de las células VHL negativas. Se han hecho también estudios para demostrar que la expresión de HIF2 $\alpha$  no sólo es necesaria sino suficiente para la formación de tumores. En este sentido, se ha observado que la inhibición de la expresión de HIF2 $\alpha$  en células VHL negativas es suficiente para inhibir el crecimiento tumoral *in vivo* (Kondo, Kim et al. 2003). Algunos autores incluso han llegado a concluir que HIF2 $\alpha$  es más oncogénico que HIF1 $\alpha$  (Mandriota, Turner et al. 2002), aunque hay discrepancias al respecto. En este sentido, otros autores han descrito que la expresión de una forma de la proteína HIF1 $\alpha$  resistente a la modificación por VHL y por tanto a degradación vía proteosoma, no es suficiente para promover tumorigénesis (Maranchie, Vasselli et al. 2002). Estos resultados indican que ambos mecanismos, HIF-dependiente y HIF-independiente, parecen esenciales para la función supresora de tumores mediada por VHL.

Sin embargo, puesto que no se conoce con seguridad ningún otro sustrato de VHL, aparte de HIF $\alpha$ , los investigadores se han preguntado si es realmente este factor el único responsable de la formación de tumores en células VHL negativas. En relación a

esto, un estudio realizado por Mack y colaboradores sugiere que en modelos tumorales de fibrosarcoma son necesarios otros cambios genéticos adicionales, además de la desregulación de HIF, para inducir tumorigénesis (Mack, Rathmell et al. 2003). Tampoco se puede excluir la posibilidad de que en humanos el desarrollo de tumores renales como consecuencia de la pérdida de VHL refleje una compleja interacción entre la desregulación de HIF2 $\alpha$  y la pérdida de una segunda función de la proteína VHL. Esta proteína ha sido implicada en diferentes funciones celulares tales como el control de ciclo celular, diferenciación y formación de matriz extracelular, aunque se desconoce si estas actividades se deben al control de HIF $\alpha$  (Kaelin 2002). VHL también se ha implicado en la formación de la matriz extracelular de colágeno IV de forma independiente de HIF $\alpha$  (Grosfeld, Stolze et al. 2007; Kurban, Duplan et al. 2007).

Por otro lado correlaciones entre el genotipo y el fenotipo de la enfermedad de VHL sugieren que VHL tiene múltiples funciones. Por ejemplo los mutantes de VHL asociados a un bajo riesgo (tipo 2A) y alto riesgo (tipo 2B) de cáncer renal son incapaces de regular HIF y algunos mutantes de VHL que mantienen la regulación de HIF están asociados a feocromocitomas familiares (tipo 2C) (Clifford, Cockman et al. 2001; Hoffman, Ohh et al. 2001). Todo esto sugiere que la formación de tumores que se da como consecuencia de la pérdida de VHL refleja la pérdida de múltiples funciones dentro de un determinado contexto celular.

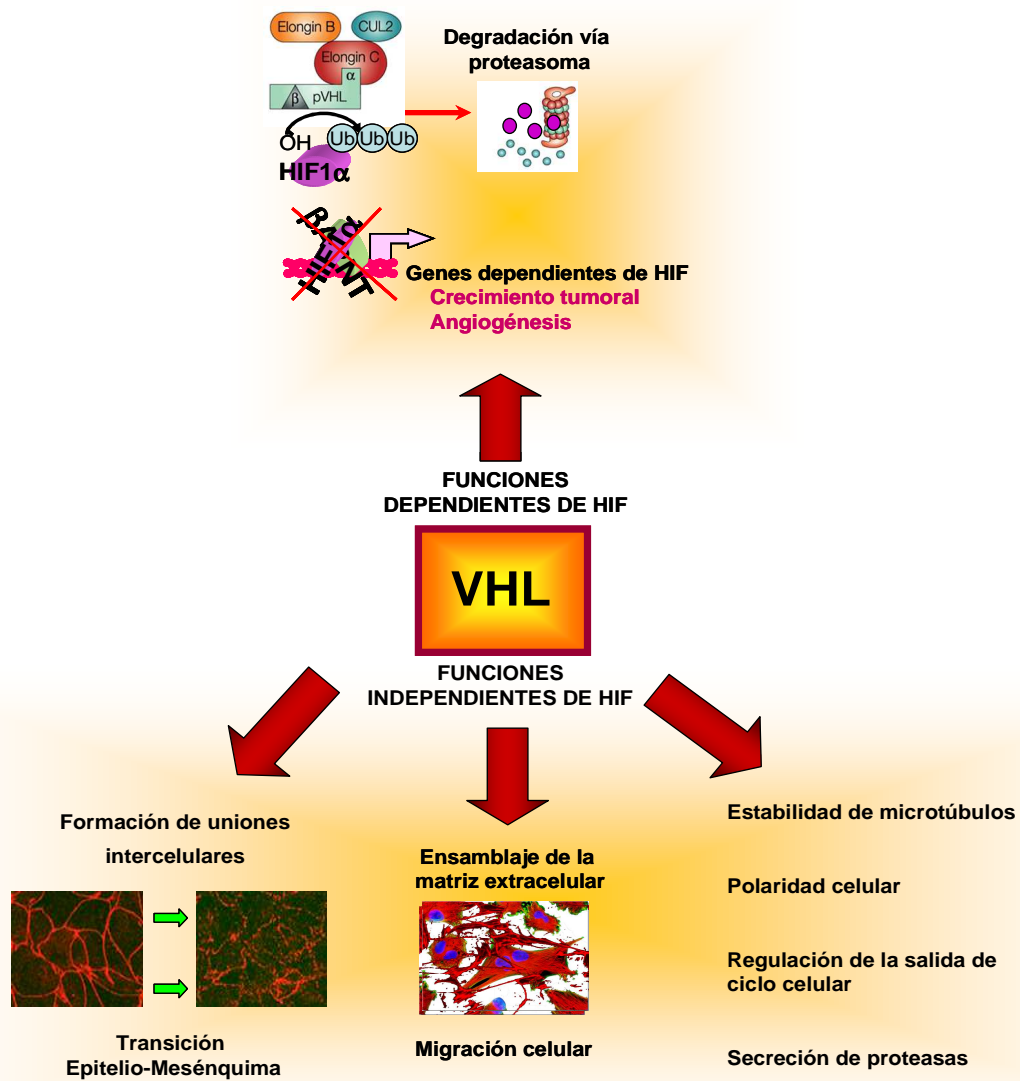
### 1.2.2. FUNCIONES INDEPENDIENTES DE HIF.

Recientemente se han descrito otras funciones celulares reguladas por VHL en las que la implicación de HIF no está todavía clara. Entre ellas la regulación de la migración e invasión (Koochekpour, Jeffers et al. 1999; Kamada, Suzuki et al. 2001; Hsu, Adereth et al. 2006), la estabilidad de microtúbulos (Hergovich, Lisztwan et al. 2003; Bluysen, Lolkema et al. 2004; Lolkema, Mans et al. 2007), el mantenimiento de la morfología epitelial y la organización de las células en monocapa (Davidowitz, Schoenfeld et al. 2001; Esteban-Barragan, Avila et al. 2002; Lewis and Roberts 2003; Calzada, Esteban et al. 2006; Esteban, Tran et al. 2006; Krishnamachary, Zagzag et al. 2006), ciclo celular y apoptosis (Bindra, Vasselli et al. 2002; Kim, Yan et al. 2004; Roe, Kim et al. 2006), ciliogénesis (Esteban, Harten et al. 2006; Lolkema, Mans et al. 2007) y , además, se

ha demostrado recientemente que podría funcionar como adaptador de proteínas kinasas regulando la actividad de NFkB (Yang, Minamishima et al. 2007).

Entre estas funciones de VHL independientes de HIF también se incluyen procesos importantes para la iniciación y progresión de tumores RCC como la formación de adhesiones fibrilares  $\beta 1$  y el ensamblaje de FN extracelular (Ohh, Yauch et al. 1998; Esteban-Barragan, Avila et al. 2002). En ratones deficientes para VHL en células endoteliales hay un fallo en el desarrollo del endotelio embrionario muriendo el embrión alrededor del día 10,5 y 12,5 al igual que en ratones deficientes para VHL (Gnarra, Ward et al. 1997). Esto sugiere que VHL tiene un papel importante en el desarrollo vascular. Estos ratones tienen una expresión de FN disminuida *in vivo* y un defecto en el ensamblaje de matriz de FN *in vitro* (Tang, Mack et al. 2006) Estos autores demuestran que la pérdida de VHL en células endoteliales provoca un defecto en el ensamblaje de la matriz de FN de forma independiente de HIF1 $\alpha$  ya que en embriones que han perdido la expresión tanto de VHL como de HIF1 $\alpha$  en células endoteliales, se observan los mismos defectos de deposición de FN. Además ratones deficientes para FN comienzan a tener problemas de desarrollo de la cresta neural y en tejidos derivados del mesodermo a día 8 del desarrollo y después de esto mueren (George, Baldwin et al. 1997) Todo esto sugiere que la regulación de FN por VHL es crítica para el desarrollo de la vasculatura.

,



**Figura 3. Funciones de VHL.** La función mas conocida de VHL es la ruta canónica de degradación de HIF $\alpha$  vía proteosoma, de tal forma que no hay transcripción de sus genes diana. Desde hace unos años se ha empezado a estudiar el papel de VHL de forma independiente de HIF, viendo que VHL juega un papel muy importante en la formación de uniones intercelulares y mantenimiento del fenotipo epitelial polarizado y en la formación del ensamblaje de la matriz de FN, entre otras.

## **2. UNIONES INTERCELULARES**

### **2.1. ADHESIÓN CÉLULA-CÉLULA**

La formación apropiada de uniones intercelulares es esencial para mantener una citoarquitectura epitelial polarizada, y la pérdida de su integridad se ha correlacionado con la iniciación y progresión tumoral (Tsukita, Furuse et al. 2001; Conacci-Sorrell, Zhurinsky et al. 2002; Thiery 2002; Matter and Balda 2003; Mullin 2004). Parte de nuestro trabajo se ha centrado en estudiar el papel de VHL en el mantenimiento de uniones intercelulares, así como la implicación de HIF en este proceso. Más concretamente hemos estudiado el papel de VHL en la formación de uniones adherentes y ocluyentes, dado que son dos de las más relevantes de los complejos de uniones intercelulares del epitelio renal. Las uniones adherentes se distribuyen a lo largo de una amplia franja de la membrana intercelular basolateral y están mediadas por una familia de glicoproteínas transmembrana llamadas cadherinas, siendo la E-cadherina o cadherina I la más abundante en el epitelio. Estas proteínas forman puentes intercelulares, a modo de cremallera, entre las células adyacentes y, a su vez, se asocian intracelularmente con el citoesqueleto de actina y con otras proteínas que señalizan por la vía de la familia de las cateninas (Conacci-Sorrell, Zhurinsky et al. 2002). Por tanto, estas uniones intercelulares no sólo son importantes para la adhesividad intercelular y la citoarquitectura epitelial, sino que también controlan procesos como la inhibición por contacto, en el que las células epiteliales dejan de proliferar cuando forman contactos adecuadamente. Las uniones ocluyentes se encuentran situadas en una estrecha franja en la zona apical de las uniones intercelulares y están mediadas por proteínas transmembrana, entre las que destacan las claudinas y las ocludinas, que interactúan con el citoesqueleto de actina mediante la familia de proteínas ZO (Matter and Balda 2003). Regulan el mantenimiento del fenotipo epitelial polarizado y, además, mediante el desarrollo de un anillo cortical de actina, controlan al flujo de solutos y agua a través de lo que se denomina la vía paracelular.

Nuestros resultados muestran que múltiples líneas celulares RCC VHL negativas tienen las uniones adherentes y ocluyentes desestructuradas, lo cual explica que las células tengan una morfología más alargada, su polaridad esté interrumpida y tengan una permeabilidad paracelular incrementada. La formación de dichas uniones, se ha

valorado estudiando la expresión de dos de sus componentes esenciales, como son la  $\beta$ -catenina y ZO-1, en distintas líneas celulares de cáncer renal que tienen afectada la expresión de VHL, y sus revertientes transfectados con VHL salvaje o mutado. Al reintroducir VHL en estas líneas celulares se revierte el fenotipo de todas estas alteraciones al fenotipo normal, por tanto en este trabajo proponemos que esta función novedosa de VHL puede ser importante para normalizar la morfología celular y su citoarquitectura epitelial. Además hemos demostrado que en esta función de VHL, analizada en la línea celular RCC 786-O VHL negativa, HIF no parece jugar ningún papel ni en la desestructuración de las uniones intercelulares ni en los cambios en la citoarquitectura celular.

La pérdida de VHL también se ha asociado con la pérdida de E-cadherina, que es crítico para la invasividad y metástasis en cáncer, restaurándose su expresión al reintroducir VHL (Esteban, Tran et al. 2006). Esta pérdida de expresión de E-cadherina es dependiente de HIF $\alpha$ . En este mismo sentido otros trabajos demuestran el aumento de varios represores de E-Cadherina como TDF3, ZFHX1A y ZFHX1B (Krishnamachary, Zagzag et al. 2006) o SIP1 y SNAIL (Evans, Russell et al. 2007) de forma dependiente de HIF $\alpha$ . Por otro lado se ha visto que en células de carcinoma renal que han perdido la expresión de VHL hay una disminución de dos proteínas que forman las uniones intercelulares ocluyentes, claudina 1 y ocludina y esto es independiente de la disminución de la expresión de E-cadherina pero sin embargo es dependiente de la expresión de HIF $\alpha$  (Harten, Shukla et al. 2009).

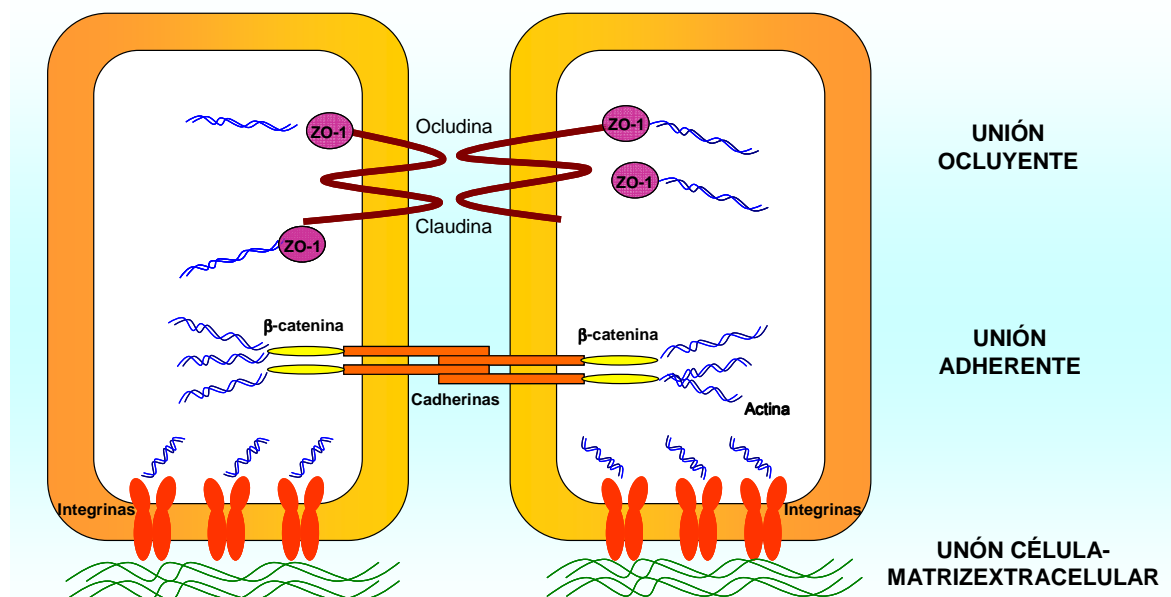
Este proceso de pérdida de uniones intercelulares se denomina transición epitélio-mesénquima (EMT) y es esencial para la progresión tumoral e invasividad. La E-cadherina es una proteína esencial para el mantenimiento del fenotipo epitelial y su pérdida induce la EMT (Batlle, Sancho et al. 2000; Cano, Perez-Moreno et al. 2000; Barbera, Puig et al. 2004).

## 2.2. ADHESIÓN CÉLULA-MATRIZ EXTRACELULAR

La interacción de las células epiteliales con la matriz extracelular conlleva la formación de estructuras complejas denominadas adhesiones célula-matriz (Zamir, Katz et al. 1999). Una de las familias de proteínas más importantes implicadas en estas uniones son las integrinas. En función de las integrinas implicadas, de la forma y de los componentes intracelulares (paxilina, vinculina, tensina y talina), estas adhesiones se clasifican en complejos focales, contactos focales clásicos y adhesiones fibrilares. A la complejidad de estas uniones por estar formadas por proteínas de anclaje y señalizadoras, se suma el hecho de que estas adhesiones son dinámicas e implican una continua formación-destrucción de las mismas que a su vez implica la modificación enzimática de muchos de sus componentes. Simplificando un poco la situación podríamos decir que los complejos focales son agregados de integrinas que se producen cuando la célula empieza a contactar con el sustrato. Los contactos focales clásicos representan la maduración de los complejos focales, son pequeños, con forma de punta de flecha y contienen integrinas  $\alpha v \beta 3$  o  $\alpha 5 \beta 1$  e intracelularmente son ricos en fosfotirosina, talina, tensina y vinculina. Las adhesiones fibrilares contienen integrinas  $\alpha v \beta 1$ , son ricas intracelularmente en tensina y constituyen estructuras más alargadas debidas a la tracción del citoesqueleto. Estas adhesiones fibrilares son esenciales para el ensamblaje y la formación de fibras de FN extracelular. Existe un cuarto tipo de adhesión célula-matriz que presenta características intermedias entre los contactos focales clásicos y las adhesiones fibrilares que son las adhesiones tridimensionales (Zajackowski, Cukierman et al. 2003).

La interacción adecuada de las células con la matriz de su entorno regula muchos aspectos esenciales del funcionamiento normal de las células. La rotura o desestructuración de la membrana basal ocurre durante la progresión tumoral y amenudo se ha visto asociada con la formación de tumores sólidos (Hanahan and Weinberg 2000). Resultados publicados en nuestro laboratorio y resultados de otros grupos demuestran que los tumores renales de célula clara que han perdido VHL no son capaces de organizar una matriz extracelular de fibronectina normal (Ohh, Yauch et al. 1998; Esteban-Barragan, Avila et al. 2002; Kurban, Hudon et al. 2006). Además, la pérdida de una adecuada matriz extracelular podría estar implicada en el comportamiento agresivo de los tumores que han perdido la expresión de VHL. Por otro lado, datos recientes indican que la alta

vascularización de los tumores no sólo depende de la ruta de degradación pVHL-HIF, sino que también parece ser una consecuencia de la pérdida de un adecuado ensamblaje de la matriz extracelular (Tang, Mack et al. 2006).



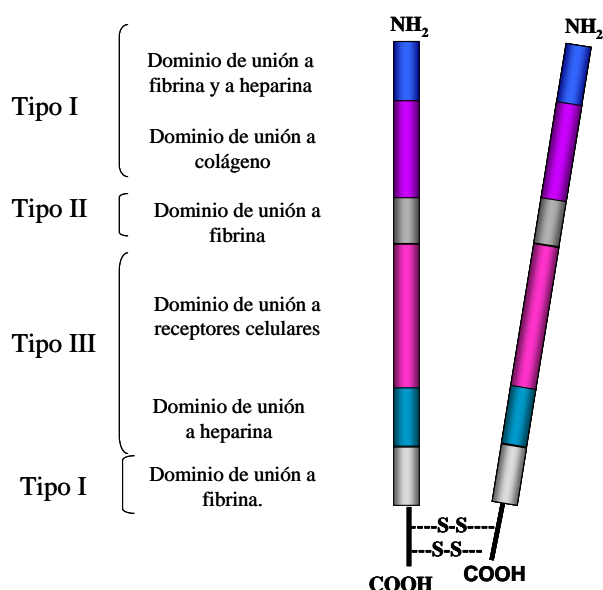
**Figura 4. Uniones intercelulares y uniones célula-matriz extracelular.** En el epitelio renal las uniones intercelulares más importantes son las uniones ocluyentes, localizadas en la parte más apical de las células, representadas por las familias de proteínas de claudinas y ocludinas (como ZO-1) y las uniones adherentes, localizadas en la zona basolateral, representada por las familias de proteínas de las cadherinas y las cateninas. En las uniones célula matriz cabe destacar la familia de proteínas de las integrinas que son las encargadas de contactar con la membrana basal. La pérdida, tanto de las uniones intercelulares como de las uniones célula-matriz extracelular, están asociados con el inicio de la progresión tumoral.

### 3. ENSAMBLAJE DE FIBRONECTINA

Las células de un epitelio organizado depositan proteínas de matriz extracelular formando lo que se denomina la membrana basal. Su composición depende de cada órgano, pero la FN es una proteína de matriz extracelular depositada por muchos tipos celulares epiteliales. Su ordenación adecuada en fibras se denomina fibrogénesis de fibronectina y regula, tanto in vivo como in vitro, muchas funciones celulares como motilidad, diferenciación, proliferación, apoptosis, forma celular y organización del



citoesqueleto (Schwarzbauer and Sechler 1999; Shaub 1999). Además de la secretada por las propias células, la FN es una proteína plasmática producida, en su gran mayoría, por el hígado (Pankov and Yamada 2002). Ratones en los que se ha silenciado la expresión del gen de la FN así como en los que no se expresa la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , receptor mayoritario de la FN (Hynes 1992), mueren a los pocos días de la implantación del embrión, lo que nos da una idea de la importancia de esta proteína.



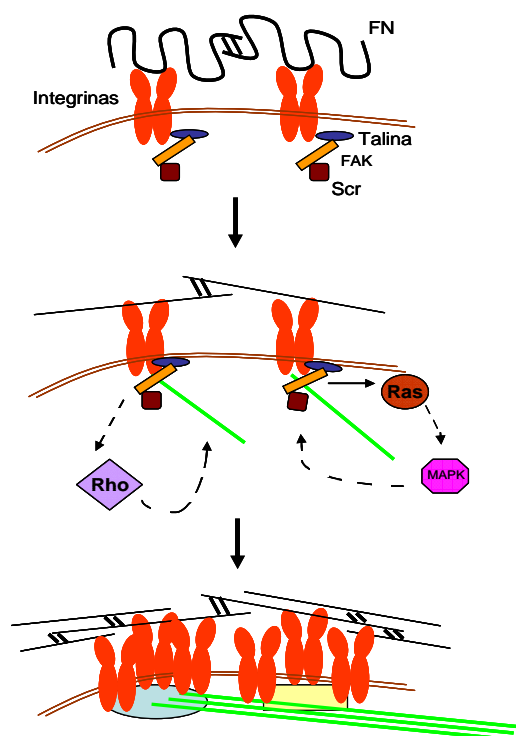
**Figura 5. Estructura de la FN.** En su extremo amino-terminal tiene unos dominios de interacción con heparina y fibrina, seguidos de un dominio de interacción con colágeno y varios dominios de interacción con integrinas. En su extremo carboxilo-terminal se encuentra la zona de dimerización con otros monómeros de FN.

El ensamblaje de la matriz extracelular de FN es un proceso complejo que requiere primeramente de la unión de la FN a las integrinas de la superficie celular. Además se necesita la formación de las fibras de estrés de actina y del proceso de contractibilidad celular (Pankov, Cukierman et al. 2000; Wierzbicka-Patynowski and Schwarzbauer 2003). Los dímeros de FN se unen a la integrina  $\alpha 5\beta 1$  de la superficie celular produciéndose el agrupamiento de integrinas unidas a FN formando los complejos focales. En este momento el ensamblaje de FN es mínimo ya que los dímeros de FN presentan una estructura tridimensional plegada que oculta los sitios de dimerización. Sin embargo, a medida de que el complejo focal madura, la tracción de uno de sus componentes, la tensina, con el citoesqueleto de actina promueve la tracción de las integrinas  $\alpha 5\beta 1$  hacia el centro de la superficie celular (proceso de contractibilidad celular). Como consecuencia de esto, los contactos focales se alargan convirtiéndose en adhesiones fibrilares (Pankov, Cukierman et al. 2000). Además esto conlleva el estiramiento de la molécula de FN y por tanto quedan expuestos los sitios críticos de

unión a otras moléculas de FN, permitiendo así la formación de fibras. En este proceso participa un miembro de la familia de las GTP-asas pequeñas, la RhoA GTPasa (Zhang, Magnusson et al. 1997; Zhong, Chrzanowska-Wodnicka et al. 1998). Con respecto a esto, en el laboratorio se había demostrado anteriormente que las células VHL negativas son incapaces de formar adhesiones fibrilares  $\beta 1$  (Esteban-Barragan, Avila et al. 2002) y fibras de estrés de actina intracelulares (Calzada, Esteban et al. 2006). Otros autores han demostrado que estas células también han perdido el adecuado ensamblaje de actina y de vinculina, impidiendo así la formación de fibras de estrés de actina (Kamada, Suzuki et al. 2001).

Además de los procesos ya mencionados, existen otros que participan en mayor o menor medida durante el ensamblaje de la matriz extracelular. Así se ha descrito que quinasas del tipo RAS, FAK, SRC o ILK también juegan un papel en el ensamblaje de matriz (Wierzbicka-Patynowski and Schwarzbauer 2003). La sobreexpresión de algunas isoformas de RAS previene el ensamblaje mediante la disminución del estado de activación de las integrinas. Sin embargo la aportación del resto de las quinasas no está clara. Por otro lado, además de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  se ha observado que las integrinas  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$  o  $\alpha v\beta 3$  son capaces de ordenar la fibronectina extracelular en ausencia de la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , aunque de forma menos eficiente.

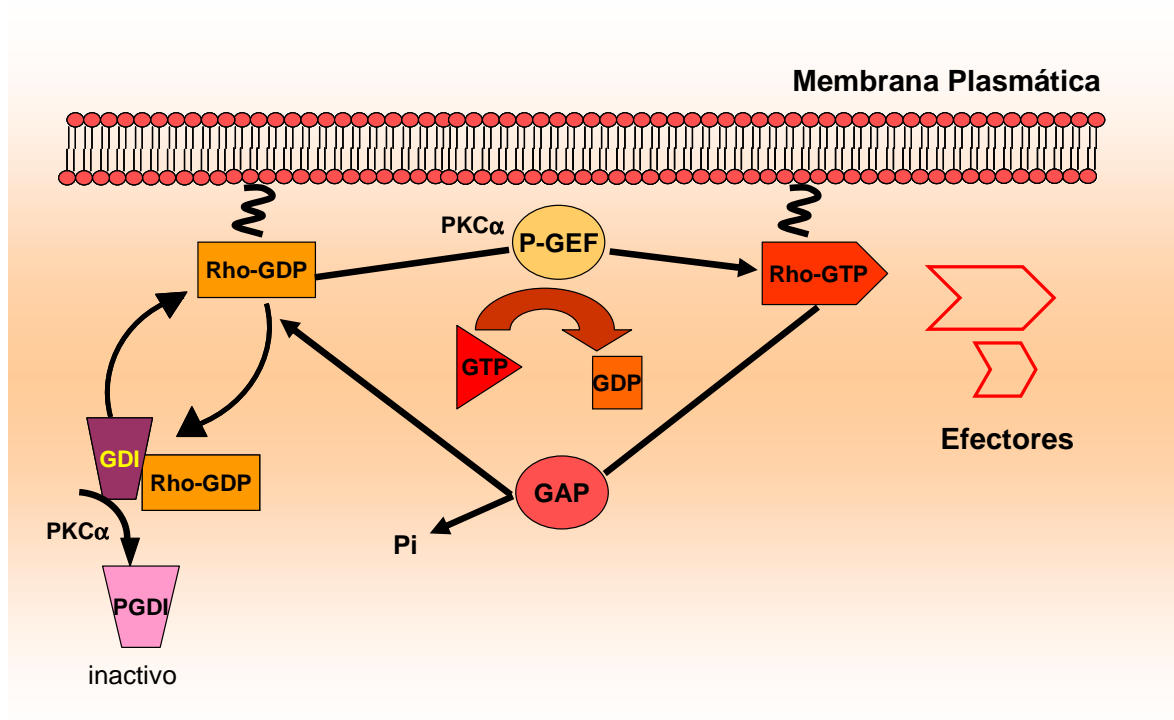
**Figura6. Fibrogénesis de la fibronectina.** El proceso de ensamblaje de FN requiere de una serie de eventos que son: unión de la FN a sus receptores, las integrinas  $\alpha 5\beta 1$ , reclutamiento de integrinas en la superficie de la membrana, tracción del citoesqueleto, cambio conformacional de la FN dejando expuestos los sitios crípticos, dimerización de la FN y formación de fibras de FN.



### 3.1. REGULACIÓN DEL PROCESO DE ENSAMBLAJE DE FN

La matriz de fibronectina no es estática sino que está continuamente siendo modificada para permitir el movimiento celular. Hay proteasas encargadas de destruir la matriz extracelular, y por otro lado hay trabajos que demuestran que las células que han perdido VHL tienen aumentada la expresión de metaloproteasas como la MT1-MMP (Petrella, Lohi et al. 2005; Petrella and Brinckerhoff 2006) o la MMP 2 y la MMP 9 (Struckmann, Mertz et al. 2008). En este sentido, si se previene el ensamblaje continuo de FN en células que ya han formado una matriz prominente, ésta acaba por destruirse con el tiempo (Sottile and Hocking 2002). En la regulación del proceso de ensamblaje de fibronectina se ha implicado a un miembro de la familia de pequeñas GTPasas, RhoA (Cali, Mazzearella et al. 1999; Danen, Sonneveld et al. 2002). Esta proteína está regulada por proteínas intercambiadoras de nucleótidos llamados GEFs, que la dejan en su forma activa, por proteínas activadoras de GTPasa, GAPs, que la dejan en su forma inactiva y por inhibidores de la disociación de GDP, GDI, que la mantienen inactiva (Etienne-Manneville and Hall 2002) y esto afecta a su papel en esta regulación.

Hemos descrito anteriormente que VHL es necesario para el ensamblaje adecuado de la matriz extracelular, sin embargo el mecanismo por el cual VHL media este proceso no está del todo claro. Para evaluar esto, nosotros hemos mirado tanto los niveles como la funcionalidad de la FN producida por las células VHL positivas y VHL negativas. También hemos estudiado el papel de la ruta de señalización que controla la formación de las fibras de estrés de actina y la contractibilidad celular en la regulación del ensamblaje de la matriz de FN en células VHL positivas y VHL negativas. Nuestros resultados demuestran que los niveles de expresión de FN en ambos tipos celulares no correlacionan con la capacidad de ensamblar la matriz de FN y que la FN producida por las células VHL es funcional y células VHL positivas son capaces de ensamblar esa FN. Además, hemos encontrado que la pérdida de la matriz de FN en células VHL negativas esta, en parte, debida a la disminución de la actividad de RhoA gracias al aumento de la actividad de p190RhoGAP. Este resultado da una nueva idea de nuevos mecanismos alterados en células de carcinoma renal VHL negativas.



**Figura 7. Regulación de la familia de pequeñas GTPasas.** Las Rho-GTPasas pueden estar unidas a GTP, siendo ésta su forma activa, o a GDP, siendo ésta su forma inactiva. Su estado de activación depende de muchas otras proteínas que están regulando a estas GTPasas. Así, hay proteínas denominadas GEFs que transforman la forma inactiva de las Rho-GTPasas en su forma activa donándoles un fosfato, y existen también otras familias de proteínas llamadas GAP y GDI, que defosforilan las Rho-GTPasas y las mantienen unidas a GDP respectivamente, dejándolas en su forma inactiva.

## ***OBJETIVOS***



La integridad de las uniones intercelulares es uno de los pilares necesarios para la arquitectura celular así como para el mantenimiento de su polaridad. Por otro lado la interacción de las células con la matriz que le rodea regula aspectos esenciales para su funcionamiento adecuado. Numerosos estudios han demostrado que defectos en la integridad de las uniones intercelulares, así como defectos en la formación de la matriz extracelular ocurren durante el desarrollo y la progresión tumoral. Teniendo en cuenta la importancia de estos procesos, este trabajo de tesis propone caracterizar y analizar en profundidad el papel de pVHL en los mismos así como identificar los mecanismos implicados. Para ello los objetivos abordados son los que se describen a continuación:

**1. Caracterización del defecto de la formación de uniones intercelulares en distintas líneas celulares de carcinoma renal.**

**2. Implicación de HIF $\alpha$  en la formación de uniones intercelulares.**

**3. Caracterización del defecto de ensamblaje de fibronectina en distintas líneas celulares de carcinoma renal así como el efecto de mutaciones en el dominio de interacción de VHL con fibronectina en el proceso de ensamblaje.**

**4. Estudio de la integridad funcional de la fibronectina producida por células VHL negativas y VHL positivas.**

**5. Estudio de los mecanismos implicados en el ensamblaje de fibronectina en las diferentes líneas celulares de carcinoma renal.**

5.1 Papel de HIF en el ensamblaje de fibronectina.

5.2 Papel de las rutas de señalización y contractibilidad celular en el proceso de ensamblaje de fibronectina en células VHL negativas y VHL positivas.





## *MATERIALES Y MÉTODOS*



## 1. Células y reactivos.

Se utilizaron diferentes líneas celulares de carcinoma renal, entre ellas el clon 786-O, deficiente en la expresión de VHL, y subclones de ésta que expresan VHL de forma estable (WT8 y WT10), una forma truncada de VHL (1-115) o el vector vacío (PRC3). Estas células fueron cedidas a nuestro laboratorio por el Dr. William Kaelin (Instituto Dana-Farber, Boston, MA). También se utilizaron diferentes mutantes de VHL, entre ellos mutantes para el fenotipo 2C entre las que se incluyen la mutación L188V, VHL (RRR) y VHL (KRR), mutantes del tipo 2A (Y112H), y mutantes del tipo 2B (C162F). Estos mutantes fueron cedidos por el Dr Michael Ohh (Universidad de Toronto, Canada). Otras líneas celulares utilizadas fueron los clones RCC4 y su correspondiente revertiente con expresión estable de VHL, cedidas amablemente por el Dr. Patrick H. Maxwell (Imperial College, Londres, Reino Unido); RCC10 parentales y sus revertientes VHL (+), cedidas por el Dr. Karl H. Plate (Universidad Johann Wolfgang Goethe, Frankfurt, Alemania) y la línea UMRC y su revertiente VHL (+) cedidas por el Dr. Michael I. Lerman y el Dr Sergey V. Ivanov (Laboratorio de inmunobiología, Instituto Nacional del cáncer, Frederick, MD). Además de estas líneas celulares se generaron en nuestro laboratorio mediante transducción retroviral las construcciones WT8 HIF2 $\alpha$  P405A; P531A [HIF2 $\alpha$  (P-A)2] y HIF2 $\alpha$  P405A; P531A; bHLH\* [HIF2 $\alpha$  (P-A)2\*]. Estas construcciones derivan de la transducción estable en las células WT8 del mutante de HIF2 $\alpha$  en las dos prolinas susceptibles a hidroxilación por las PHDs (P405A y P531A) o de su transducción con el mutante en ambas prolinas y en el dominio bHLH de transactivación. Todos los tipos celulares se cultivaron en medio RPMI 1640 con GLUTAMAX-I (Invitrogen, San Diego, CA) suplementado con 100 unidades/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin y un 10% de suero fetal bovino y se crecieron a 37°C y al 5% de CO<sub>2</sub>. Las células empaquetadoras utilizadas para la transducción (GP2-293) se crecieron en medio DMEM complementado con 10% de suero fetal bovino, 100 unidades/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin en las mismas condiciones de cultivo descritas anteriormente.

Los experimentos en hipoxia se realizaron en una cámara de hipoxia donde se podía regular de forma exacta la concentración de oxígeno (400 hypoxia Workstation,

Ruskin Technology, West Yorkshire, United Kingdom). Para ello las células se incubaron durante los tiempos indicados en cada experimento al 1% de oxígeno. En los ensayos en los que se usaron drogas, estas se añadieron 30 ó 40 minutos antes de someter a las células a otro tratamiento.

Los anticuerpos que se usaron en este trabajo incluyen anticuerpos monoclonales anti- $\beta$ 1 integrina (TS2/16 y VJ1/14) y anti-VHL (1:500) (clon Ig32, PharMingen, San Diego, CA), anti-ZO1 (1:500) (N-term, Zymed Laboratories, San Francisco, CA), anti- $\beta$ -catenina (1:500) (Clon 14, BD Biosciences, San Jose, CA), anti-fibronectina (1:500) (H-300, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-RhoA (1:500)(Clon 26C4, Santa Cruz Biotechnology), anti-p190RhoGAP (1:1000)(Clon 30, BD Transduction laboratories, San Jose, CA), anti-fosfotirosina (1:1000) (PY20, Biomol, Plymouth Meeting, PA), anti-paxilina (BD Biosciences), anti- $\beta$ 1 integrina activada (1:1000) (HUTS21), cedido por el Dr Carlos Cabañas (CSIC, Madrid), anti HIF2 $\alpha$  (1:1000) (Ab199, Novus Biologicals, Littleton, CO) y anti-Tubulina (1:2000) (Clon DM1A, Sigma, St. Louis, Missouri), DAPI (1:2000)(DAKO, Glostrup Dinamarca), PKC delta (1:1000)(Clon 14, BD). Para los experimentos de fluorescencia se utilizaron los anticuerpos secundarios Alexa 488 anti-ratón IgG (1:1000), Rhodamina-X anti-conejo IgG (1:500) (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) y HRP anti-ratón (1:5000) o anti-conejo (1:3000) para los experimentos de inmunotransferencia.

El ácido lisofosfatídico (LPA) y el inhibidor de Rho Kinasa (ROCK) Y-27632 son de Calbiochem, La Jolla, CA.

## **2. Inmunodetección mediante microscopía de fluorescencia.**

Para estudiar la formación de uniones intercelulares se analizó la localización de ZO-1 y  $\beta$ -catenina mediante microscopía confocal de fluorescencia. Las células se crecieron en cristales de inmnofluorescencia acoplados en placas de 24 pocillos. Se plaquearon 150.000 células por cristal y se dejaron creciendo de 3 a 5 días hasta alcanzar confluencia. Las células se fijaron durante 15 minutos con paraformaldehído al 3% en PBS, se lavaron con TBS (0.1 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl) y se permeabilizaron con tritón X-100 al 0.5% durante 10 minutos. Para evitar uniones inespecíficas los cristales se

bloquearon durante 30 minutos con TNB (0.1 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.5% agente bloqueante; Boehringer Mannheim GmbH). Después se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo primario correspondiente, (anti- $\beta$ -catenina o anti-ZO1) y se lavaron varias veces con TBS-Tween para eliminar el anticuerpo no unido. Los anticuerpos secundarios se incubaron durante 30 minutos a 37°C y el exceso se lavó con TBS-0,5% Tween (TBS-T). Por último los cristales se lavaron con agua destilada y se montaron en portas de cristal con Mowiol. Para los ensayos de doble inmunofluorescencia, los anticuerpos primarios y secundarios se incubaron por separado utilizando suero de ratón para evitar reacciones cruzadas. Para la tinción doble de los filamentos de actina se usó faloidina acoplada a Alexa 488.

Para analizar el ensamblaje de fibronectina las células se crecieron durante 3 días sobre cristales sin tratar o previamente tratados con FN (20  $\mu$ g/ml). Se cultivaron en medio RPMI suplementado con un 10% de suero fetal bovino sin FN. Las células se levantaron con una solución 20mM NH<sub>4</sub>OH, 0.5% TritonX100 en PBS. Los cristales se fijaron con paraformaldehído al 3% y se lavaron con TBS-T. Posteriormente se bloquearon con TNB y se incubaron durante 1 hora a 37°C con el anticuerpo policlonal anti-fibronectina, se lavaron con TBS-T y se incubaron durante 30 minutos a 37°C con el anticuerpo secundario acoplado a Rhodamina. Por último se lavaron con TBS-T y agua y se procesaron tal como se describe en el párrafo anterior.

Para la activación de RhoA, las células se incubaron con ácido lisofosfatídico (LPA) a una concentración de 6  $\mu$ M, con el fin de inducir la formación de fibras de estrés de actina. Para la inhibición de RhoA, las células se incubaron con 5  $\mu$ M del compuesto Y-27632.

Para el análisis de la formación de contactos focales y adhesiones fibrilares se plaquearon las células y a las 4 horas y 24 horas de cultivo se tiñeron con anticuerpos anti-paxilina y anti-fibronectina. Estos experimentos se hicieron en presencia de fibronectina exógena (20 $\mu$ g/ml).

El análisis de las uniones intercelulares se hizo mediante microscopía confocal con el sistema Leica TCS-SP (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) y la formación

de matriz de fibronectina se analizó mediante microscopia de fluorescencia en microscopio Leica DMR equipado con el programa de análisis QFISH (Leica Microsystems). Para cuantificar el ensamblaje de fibronectina las imágenes se adquirieron con las mismas condiciones de intensidad de fluorescencia y se cuantificaron usando el programa Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). La intensidad de fluorescencia de las células VHL negativas se consideró como el 0% de ensamblaje y se restó al resto de las imágenes. La intensidad de fluorescencia de las células VHL positivas, utilizadas como control positivo, se consideró el 100%. La recuperación del ensamblaje de FN con las diferentes condiciones experimentales se representó como porcentaje frente al control positivo.

### **3. Inmunodetección de proteínas mediante Western blot.**

Inmediatamente después de los diferentes tratamientos, las células se lavaron con PBS frío y se lisaron con Laemli (2% SDS, 10% glicerol, 10mM DTT, 62mM Tris pH 6.8 y 0,004% de azul de bromofenol). Las proteínas contenidas en estos lisados se resolvieron en geles de poliacrilamida-SDS al 8 o el 10%, posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad). Después de bloquear las membranas con TBS-T (50mM Tris pH 7.6, 150mM NaCl, 0,1% Tween-20 y 5% de leche en polvo desnatada) se incubaron al menos 12 horas a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes. Tras la incubación, se lavaron las membranas para eliminar el exceso de anticuerpo primario y se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios acoplados a HRP (Horseradish peroxidasa). La unión del anticuerpo se detectó mediante quimioluminiscencia potenciada con ECL (Amersham Biosciences) en un analizador digital de imagen (Fujifilm LAS-1000 CH).

### **4. Fraccionamiento del material soluble e insoluble.**

Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos con RPMI 1640 y GLUTAMAX (Invitrogen) suplementado con 5% de suero fetal bovino sin FN. Las células se lavaron con PBS frío y se lisaron con 200 µl de un tampón de lisis con deoxicolato (2% deoxicolato, 20 mM Tris-HCl, pH 8.8, 2 mM PMSF, 2 mM EDTA y la mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa de Roche). El lisado se centrifugó a 15.000xg durante 20 minutos a 4°C y el material insoluble en deoxicolato se resuspendió con un tampón de

solubilización (1% SDS, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM PMSF, 2 mM EDTA y la mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa de Roche). Para obtener los lisados totales, las células se lisaron con un tampón de lisis RIPA (150mM NaCl, 10mM Tris HCL, 1% NP40, 0.5% Deoxicolato sódico, 0.1% SDS, 10mM Pirofosfato sódico, 1mM EGTA, 10mM NaF, 1mM Ortovanadato sódico, 0.5mM PMSF e inhibidores de proteasas). Finalmente los extractos insolubles en deoxicolato y los lisados totales se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y la inmunodetección se hizo utilizando quimioluminiscencia (Amersham Pharmacia Biotechnology, Piscataway, NJ) y se analizó con un analizador digital de imagen luminiscente (Fujifilm LAS-1000 CH).

## 5. Medida de la permeabilidad celular.

Para determinar la permeabilidad a través de una monocapa de células se utilizaron filtros de policarbonato de 6.5 micras de diámetro y un tamaño de poro de 0.4 micras (Transwell Costar, Cambridge MA). Las líneas celulares RCC se cultivaron durante varios días en 150 µl de medio de cultivo. Una vez formada la monocapa de células, se le añadió 100 µl de dextrano marcado con FITC (77kD) y en la parte inferior del *transwell* se añadió 600 µl de medio sin suero y se incubaron a 37°C durante los tiempos indicados. La cantidad de dextrano-FITC presente en la parte inferior se midió a los diferentes tiempos con un lector de fluorescencia (Bio-Tek FL500). El número inicial de células se ajustó cuidadosamente dependiendo del tipo celular.

## 6. PCR cuantitativa a tiempo real.

El análisis de expresión génica de los diferentes genes se hizo mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Inmediatamente después de los tratamientos las células se lisaron en 1 ml de Ultraspec (Biotecx, Houston, Tx). El RNA total se extrajo, se cuantificó y su integridad se comprobó en un bioanalizador (2100 bioanalyser, Agilent). Se utilizaron 2 µg de RNA para retrotranscribir a cDNA (Improm-II transcriptasa reversa, Promega), y se utilizó 1 µl del cDNA resultante como molde para las reacciones de amplificación llevadas a cabo con LC Fast Start DNA master SYBR Green utilizando el sistema Light Cycler (Roche Applied Science) y los datos se analizaron con el Light Cycler software 3

versión 3.5.28 (Idaho Technology Inc.). Para el análisis, el fragmento a amplificar de cada gen se clonó y se generó una curva patrón. El número de copias del gen de interés en cada muestra se extrapola de la correspondiente curva patrón mediante el software indicado. Para cada muestra se realizaron medidas por triplicado, y el número de copias del gen se normalizó por la cantidad de  $\beta$ -actina. Las parejas de oligonucleótidos usados se diseñaron de tal manera que hibridaran en diferentes exones para evitar amplificaciones de DNA genómico. El diseño de los oligonucleótidos se realizó con ayuda del Light Cycler Probe Design Software versión 1.0 (Idaho Technology Inc.). Así para amplificar  $\beta$ -actina la pareja de oligonucleótidos fue CCCAGAGCAAGAGAGG para el sentido y GTCCAGACGCAGGATG para el antisentido; para PHD3 fueron GATGCTGAAGAAAGGGC para el sentido y CTGGCAAAGAGAGTATCTG para el antisentido; y para FN AGGATTACCGGCTACAT para el sentido y GTGACGAAAGGGGTCT para el antisentido.

### 7. Transducción celular mediante infección retroviral.

La expresión estable de formas mutadas de HIF2 $\alpha$ , RhoA y el interferente de HIF2 $\alpha$  se hizo mediante transducción retroviral. Células empaquetadoras GP2-293 (CLONTECH) se transfectaron con fosfato cálcico en placas de 60 mm de diámetro con 3,5  $\mu$ g de los vectores retrovirales que codifican para HIF-2 $\alpha$  P405A;P531A [HIF-2 $\alpha$  (P-A)2], HIF-2 $\alpha$  P405A;P531A;bHLH\* [HIF-2 $\alpha$  (P-A)2\*], o el vector vacío pBabe, 4  $\mu$ g de un vector de expresión que codifica para Gag/POL (pNGLV-MLV-gag-pol) y 2  $\mu$ g de otro que codifica para la proteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (pVSV-G). Tras 24 horas de transfección se les cambió el medio, y 48 horas postransfección se recogió el sobrenadante celular conteniendo el virus, se filtró con filtros de 0,22 $\mu$ m y se diluyó 1:2 con medio fresco. Posteriormente se añadió polibreno a una concentración final de 6  $\mu$ g/ml. Un volumen de 1,5 ml de este medio con retrovirus se usó para infectar células 786-O VHL positivas cultivadas en placas de 60 mm de diámetro a una confluencia del 20%. Las células se incubaron con los retrovirus durante 24 horas, tras lo cual se les cambió el medio y se les dejó recuperarse de la infección durante 48 horas, a partir de las cuales se seleccionaron las células infectadas añadiendo puromicina en el medio de cultivo a una concentración final de 1  $\mu$ l/ml.



Para interferir la expresión de HIF2 $\alpha$  se mezclaron 10  $\mu$ g de los oligonucleótidos 5'-GATCCCCGCCATGAACAGCATCTTTGTTCAAGAGACAAAG ATGCTGTTTCATGGCTTTTAA-3' y 5'-AGCTTAAAAAGCCATGAACAGCATCTTT GTCTCTTGAACA AAGATGCTGTTTCATGGCGGG-3' en un tampón que contenía 50 mM de Tris-HCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 mM de NaCl y 1mM de ditioeritritol (DTE) a pH 7.5. Esta mezcla se calentó durante 4 minutos a 100° C y luego se dejó enfriando durante al menos 12 horas para permitir su hibridación. A continuación se clonó en el plásmido pSuperRetroPuro (Oligoengine) siguiendo las instrucciones del fabricante. Como control negativo se hibridaron y clonaron de la misma forma los siguientes oligos con secuencias inespecíficas: 5'-GATCCCCATAGCGGTCGCAATCGAAATTCAAGAGATTTCGATTG CGACCGCTATTTTAA-3' y 5'-AGCTTAAAAAAT AGCGGTCGCAATCGAAATCTC TTGAATTTCGATTGCGACCGCTATGGG-3'.

Las construcciones de una forma de RhoA constitutivamente activa (RhoA Q63L) o un dominante negativo (RhoA N19) se obtuvieron del laboratorio del Dr. Silvio Gutkind (Bethesda, Maryland). Estas construcciones se clonaron en el vector retroviral pLZR IRES-GFP en un sitio BamH1/EcoR1 y se procedió a la infección de las células 786-O tal como se ha descrito anteriormente.

## 8. Purificación de la FN secretada por células VHL (+) y VHL (-).

La purificación de la FN secretada por las diferentes líneas celulares VHL (+) y VHL (-) (786-O, RCC4 y RCC10) se hizo mediante cromatografía de afinidad utilizando columnas con gelatina-agarosa (Sigma). Las diferentes líneas celulares se crecieron en frascos T175 con medio RPMI suplementado con un 10% de suero sin FN, en agitación y a 37°C. Tras 4-5 días se recogió el medio (500 ml por tipo celular) y se sembró en la columna de gelatina-agarosa. La FN unida a la matriz se eluyó con 4M de urea y posteriormente se dializó frente a PBS. El grado de pureza de la fibronectina eluida se analizó mediante SDS-PAGE y posteriormente se cuantificó mediante el método Bradford (reactivo de BioRad).

### 9. Ensayos de adhesión celular.

Los ensayos de adhesión celular se hicieron en placas Maxisorb de 96 pocillos (Costar) utilizando como sustrato de adhesión FN (5µg/ml) purificada de células VHL+ o VHL-. Las placas se trataron con la fibronectina durante 12 h a 4°C y posteriormente se bloquearon con 1% BSA en PBS durante 30 min. Las células resuspendidas en medio M199 0.1% BSA (20x10<sup>3</sup> células/pocillo) se incubaron durante 1h a 37°C al 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo se lavaron las placas con PBS para eliminar las células no adheridas y las adheridas se fijaron con 1% glutaraldehído en PBS y se tiñeron con 1% cristal violeta en PBS. Finalmente se lavaron las placas con agua destilada y se cuantificó la absorbancia a 590nm en un lector de placas (ORION-2). Como control negativo se utilizó la adhesión de las células a BSA y la absorbancia resultante se le restó a todas las muestras.

### 10. Ensayos de actividad de RhoA.

Para medir la actividad de RhoA se utilizó el dominio de unión a Rho GST-rhotekina (GST-C21) cedido amablemente por el Dr. John Collard (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Netherlands). Para ello se utilizaron 7x10<sup>6</sup> células 786-0 VHL positivas, VHL negativas y L188V y se lisaron en tampón RIPA. Los lisados se centrifugaron a 20.000xg durante 15 minutos a 4°C. Los lisados se cuantificaron y 15 µl del lisado se reservaron para determinar la cantidad total de GTPasa RhoA. El resto se utilizó para los ensayos de arrastre con el dominio GST-C21 acoplado a una matriz de glutation-agarosa. Los lisados se incubaron durante toda la noche a 4°C. El exceso de proteína no unida a la matriz se eliminó mediante lavado y centrifugación. Finalmente la proteína retenida se solubilizó hirviendo las muestras en Laemmli. La cantidad de RhoA total y unido se sometió a electroforesis y transferencia en membranas de nitrocelulosa. La cantidad de RhoA total presente en los lisados totales y la fracción activa unida a GST-C21 se detectaron mediante un anticuerpo anti-RhoA. La cantidad de RhoA activo se normalizó con respecto al total y ambas se normalizaron con respecto al control de carga (α-tubulina). Para hacer el análisis estadístico la cantidad de proteína total y activa se cuantificó mediante densitometría y se analizó con el programa Quantity-One™ program (Bio-Rad).

Para medir la actividad de RhoA en células RCC4 VHL positivas y VHL negativas se utilizó el kit RhoG Elisa (Cytoskeleton).

## **11. Análisis de la fosforilación de p190RhoGAP.**

El análisis de actividad o estado de fosforilación de p190RhoGAP se hizo mediante inmunoprecipitación de la proteína y posterior detección de tirosinas fosforiladas. Para ello  $6 \times 10^6$  células RCCs VHL positivas y VHL negativas se lisaron en 500  $\mu$ l de tampón RIPA y los lisados resultantes se incubaron 12 h a 4°C con 4  $\mu$ g de un anticuerpo monoclonal anti-p190RhoGAP (Upstate) previamente acoplado a una matriz de proteína G-agarosa (Pierce), o con un anticuerpo control IgG1 anti-CD45 T200. La fracción no unida a la matriz se eliminó con lavados sucesivos con tampón RIPA, y la fracción unida se solubilizó hirviendo las muestras en Laemmli. Para la inmunodetección de las proteínas fosforiladas se usó un anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (PY20) seguido de un anticuerpo secundario acoplado a HRP. La fracción total se analizó mediante inmunodetección con el mismo Ab. monoclonal utilizado en la inmunoprecipitación. El análisis estadístico de la cantidad de proteína total y fosforilada se hizo analizando la cantidad de proteína mediante densitometría y posterior análisis con el programa Quantity-One™ program (Bio-Rad).

## **12. Silenciamiento mediante siRNA.**

El silenciamiento de p190RhoGAP en células 786-O se hizo mediante RNA de interferencia utilizando oligonucleótidos siRNA humanos dirigidos contra p190RhoGAP (5`GAACAGCGAUUUAAGCAUTT-3` y 3`AUGCUUUAAAUCGCUGUUCTT-5`) (Eurogentec). Las células se transfectaron usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) con oligonucleótidos siRNA control o con los específicos para p190RhoGAP. Tres días después de la transfección se analizó el grado de interferencia y el efecto de la misma en los distintos procesos de interés analizados en esta tesis.

### **13. Análisis estadístico de los datos.**

El análisis estadístico de las muestras se realizó con al menos tres resultados de experimentos independientes, de los cuales se calculó el valor medio, la desviación estándar y la significancia estadística mediante el test de Student.

## ***RESULTADOS***

---



## **1.- VHL es necesario para la correcta formación de uniones intercelulares en células de carcinoma renal humano (RCCs)**

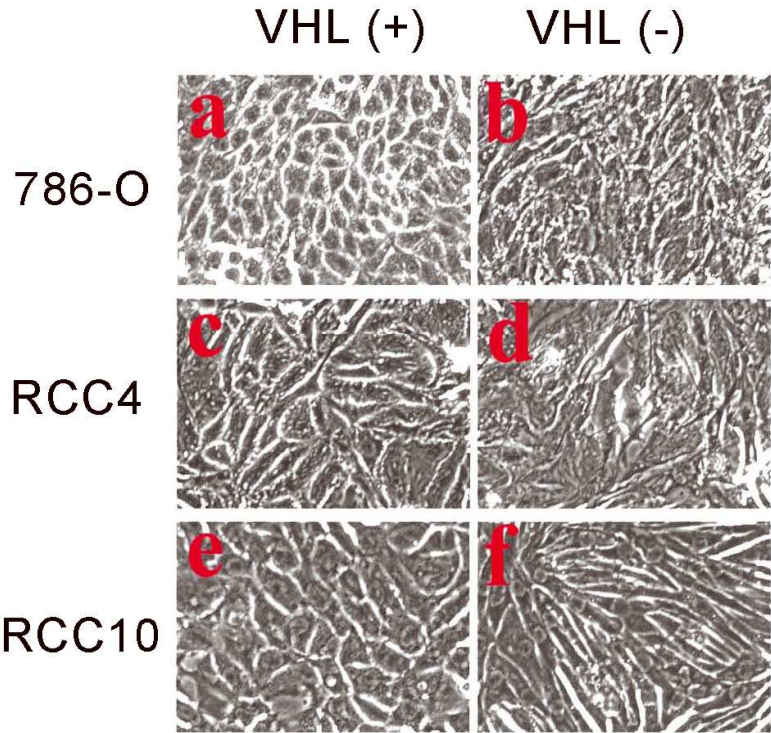
### **1.1 Papel de VHL en la formación de uniones intercelulares en células RCC.**

Las uniones adherentes y ocluyentes son estructuras especializadas de las uniones célula-célula y son esenciales para el mantenimiento de la arquitectura celular y su organización en epitelios celulares (Conacci-Sorrell, Zhurinsky et al. 2002; Matter and Balda 2003; Mullin 2004). Las células RCC VHL negativas (VHL (-)) presentan una forma alargada y crecen de forma desorganizada. Sin embargo la re-expresión de la proteína VHL (VHL (+)) en estas células restaura su fenotipo epitelial (Davidowitz, Schoenfeld et al. 2001; Esteban-Barragan, Avila et al. 2002) (Fig. 8A). Por tanto estas modificaciones fenotípicas nos sugirieron que VHL quizás fuera necesario para la formación de uniones intercelulares en células RCC. Para confirmar nuestra hipótesis, realizamos ensayos de inmunofluorescencia con doble tinción de componentes esenciales de uniones adherentes ( $\beta$ -catenina) y uniones ocluyentes (ZO-1) en varias líneas celulares de RCC. El análisis mediante microscopía confocal del plano horizontal de la monocapa en la línea celular 786-O transfectadas con VHL salvaje, mostró una distribución de  $\beta$ -catenina bien definida en las áreas de contacto célula-célula (Fig. 8B, a y c, panel superior). Además, la reconstrucción vertical del mismo campo de estas imágenes mostró una distribución clásica de la membrana basolateral de la célula (Fig. 8B, a y c, panel inferior). Las mismas imágenes con el marcaje de ZO-1 mostraron una delimitación clara y bien definida de las fronteras celulares (Fig. 8B, b y c, panel superior), mientras que las correspondientes imágenes verticales localizaban ZO-1 exclusivamente en las regiones apicales de la membrana lateral (Fig. 8B, b y c, panel inferior). Por el contrario, las células 786-O VHL (-) mostraron una pauta muy irregular y discontinua de  $\beta$ -catenina, siendo aun más pronunciada para ZO-1. Esto se pudo también apreciar en las secciones verticales reconstituidas por el ordenador (Fig. 8B, d-f, paneles superior e inferior). Las diferencias en la distribución de  $\beta$ -catenina y ZO-1 no sólo se dieron en la línea celular 786-O sino que

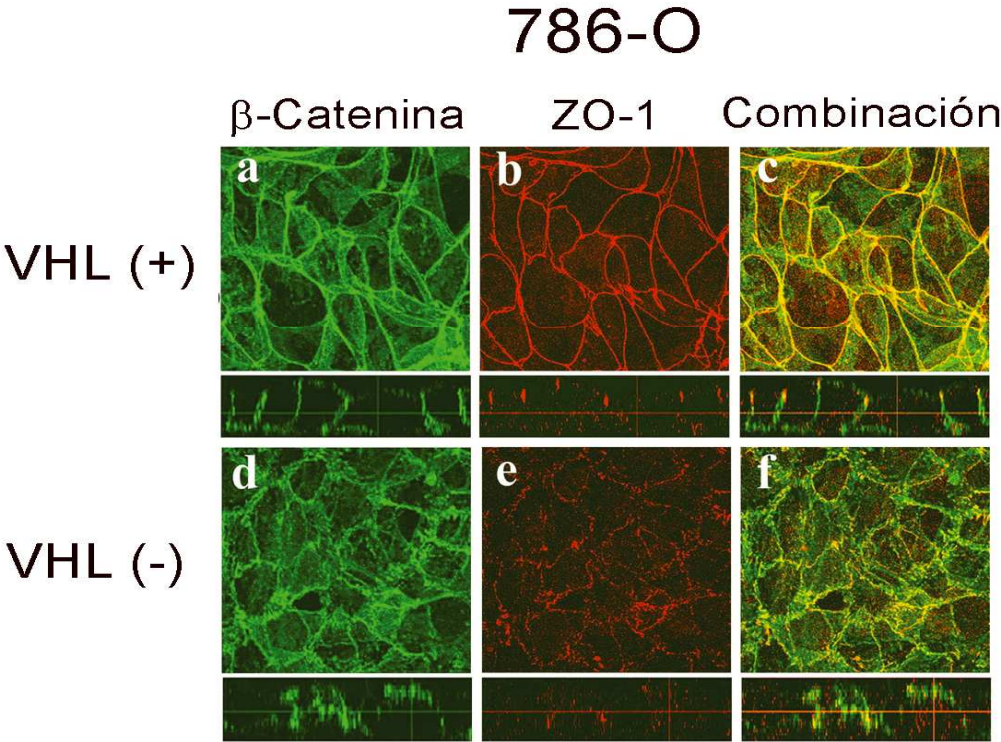
los resultados se reprodujeron en las líneas celulares RCC10 y RCC4 tanto VHL (-) como las transfectadas de forma estable con VHL salvaje (VHL (+)) (Fig. 8C y D). Además de estos experimentos se hicieron inmunofluorescencias dobles para la integrina  $\beta 1$  (verde) y ZO1 (rojo) en células 786-O. Esta integrina se distribuye sobre toda la superficie de las células epiteliales indicando de forma muy clara la delimitación de las fronteras celulares y el espesor de la monocapa. Las imágenes del plano vertical de la integrina  $\beta 1$  mostraron una distribución regular y un mayor grosor de la monocapa en las células transfectadas con VHL (Fig. 9A). Por el contrario, las células VHL (-) presentaban una distribución irregular y el grosor de la monocapa era menor, observándose en algunos casos una monocapa totalmente desestructurada (Fig. 9B). Además, la existencia de espacios vacíos entre estas células (Fig. 9B; ver la flecha blanca), daba muestra de la incapacidad de las mismas para establecer uniones intercelulares de forma apropiada. Las imágenes verticales de ZO-1 mostraron puntos bien definidos en la zona apical de las células 786-O VHL (+) (Fig. 9A, ver flecha rosa), mientras que la distribución era menos definida e irregular en células VHL (-) (Fig. 9B). Esta falta de interacción celular entre células VHL (-) comparadas con las VHL (+) era aun más evidente en las imágenes horizontales (sólo se muestra la tinción para la integrina  $\beta 1$ ) que mostraban el plano de contacto de la célula con el sustrato (Fig. 9C y D; ver flechas blancas).



A

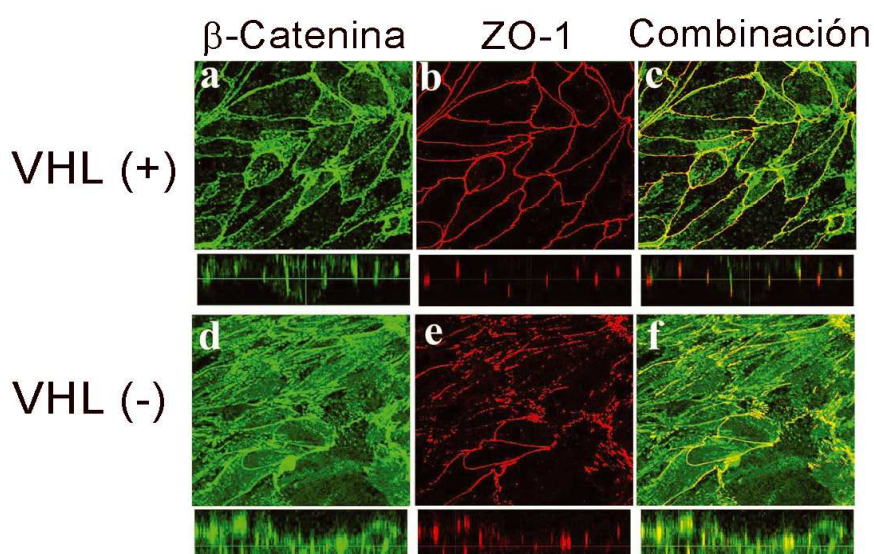


B



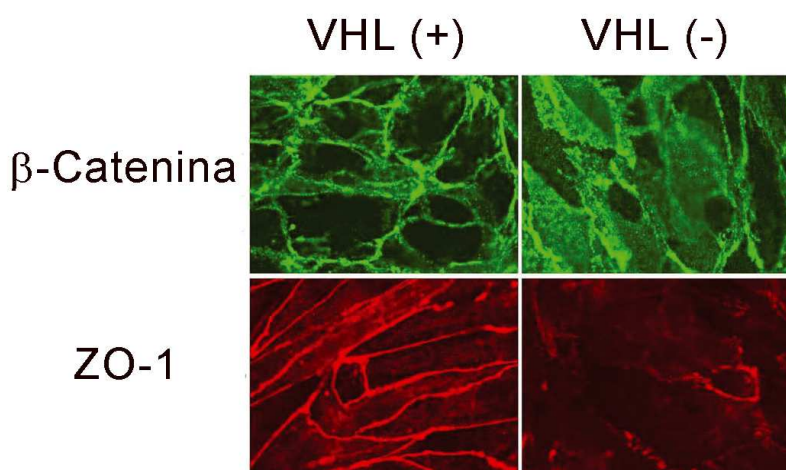
C

RCC10



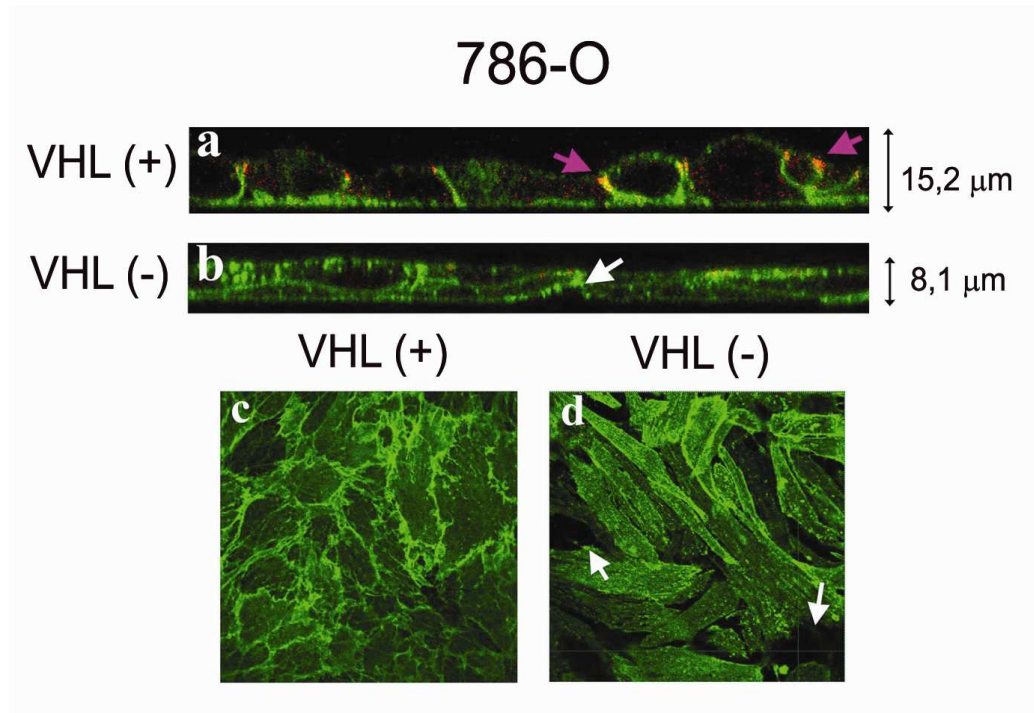
D

RCC4



**Figura 8. Organización de las uniones ocluyentes y adherentes en células 786-O, RCC10 y RCC4 VHL positivas y negativas.** (A) Análisis mediante microscopía de contraste de fases de los cambios morfológicos tras la re-expresión de VHL en células RCC VHL negativas. Las líneas celulares 786-O, RCC10 y RCC4 transfectadas con VHL (a-c) y VHL negativas (d-f) se crecieron hasta confluencia en placas de 24 pocillos. (B-D) Análisis mediante microscopía confocal de líneas celulares 786-O (B), RCC10 (C) y RCC4 (D). Las células se crecieron hasta confluencia en cristales de inmunofluorescencia durante 3-5 días, posteriormente se

fijaron y se hizo una doble tinción para  $\beta$ -catanina y ZO-1. Se analizaron tanto secciones horizontales como reconstrucciones verticales de las 786-O y RCC10 del mismo campo. Las imágenes son representativas de seis campos diferentes tomados de una serie de al menos cuatro experimentos distintos.



**Figura 9. VHL regula la citoarquitectura epitelial en las células RCC.** Análisis mediante microscopía confocal de las células 786-O VHL positivas y VHL negativas. Las células se crecieron hasta confluencia sobre cristales de inmunofluorescencia durante 3-5 días, posteriormente se fijaron y se hizo una doble tinción con un anticuerpo contra la integrina  $\beta 1$  y otro contra ZO-1. En las secciones verticales (A y B) se puede observar la integrina  $\beta 1$  en verde y ZO-1 en rojo. En las secciones horizontales (C y D) se muestra únicamente la tinción de la integrina  $\beta 1$ . El espesor de la monocapa de células es la media de diez campos diferentes y se muestra un experimento representativo.

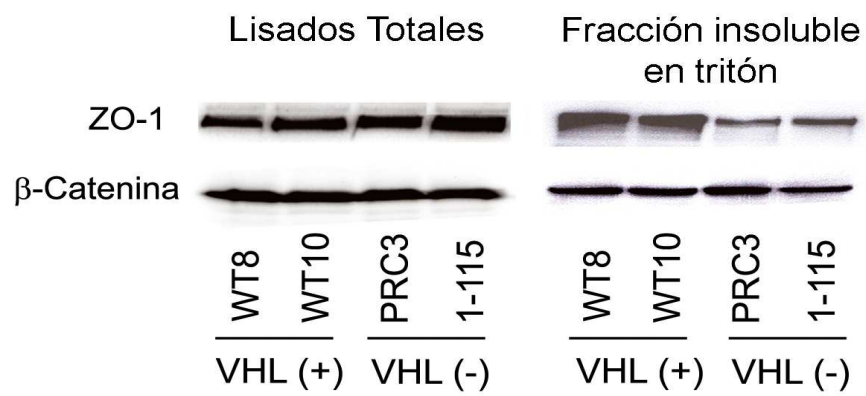
## 1.2 La inactivación de VHL en células RCC interrumpe la asociación de ZO-1 con el citoesqueleto de actina y aumenta la permeabilidad paracelular.

El anclaje de proteínas de las uniones intercelulares al citoesqueleto es esencial para su función y para la estabilidad en zonas de contacto célula-célula (Tsukita, Furuse et al. 2001; Conacci-Sorrell, Zhurinsky et al. 2002; Matter and Balda 2003). Por tanto nuestro

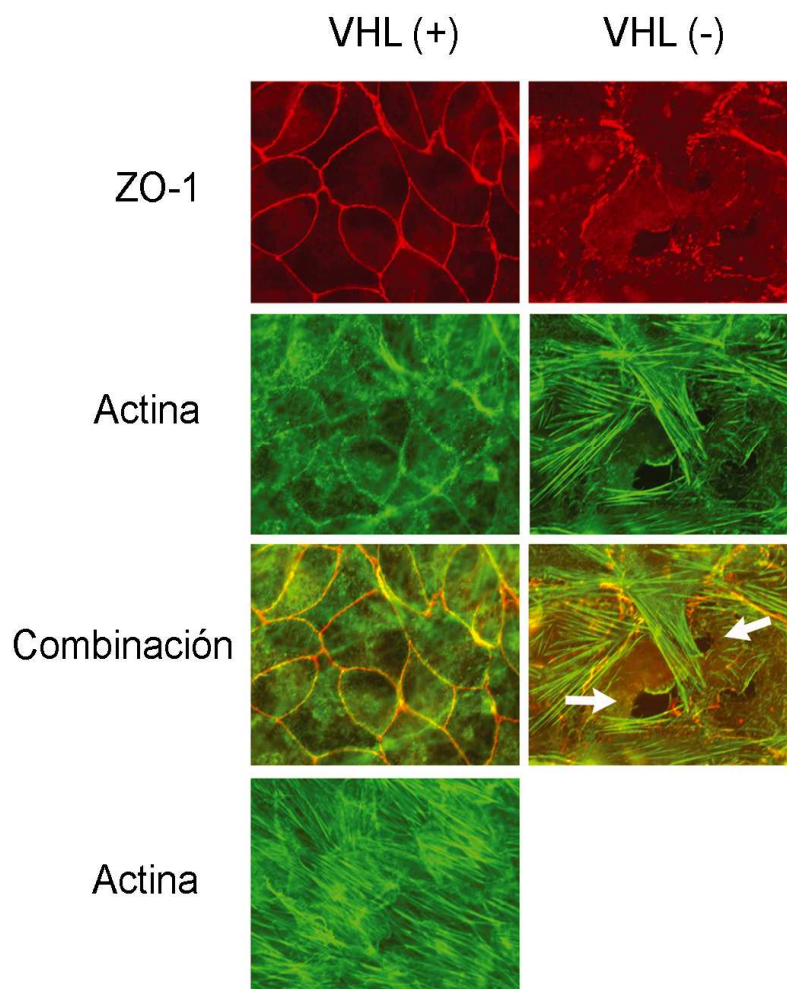
objetivo era estudiar si VHL estaba modulando la interacción de  $\beta$ -catenina y ZO-1 con el citoesqueleto de actina en la línea celular de las 786-O. Para ello se obtuvieron extractos celulares utilizando detergentes de astringencia media para solubilizar moléculas que no forman parte del citoesqueleto. Las fracciones insolubles y los lisados totales se analizaron mediante Western blot utilizando los anticuerpos correspondientes. Nuestros resultados indicaron que los niveles de expresión de  $\beta$ -catenina y ZO-1 en los lisados totales de células 786-O eran semejantes en las células VHL negativas y en las transfectadas con VHL (Fig. 10A). Igualmente, tampoco se observaron diferencias en la fracción insoluble de citoesqueleto que se asociaba a  $\beta$ -catenina. Sin embargo, la cantidad de citoesqueleto que se asociaba a ZO-1 disminuía notablemente en células VHL negativas (Fig. 10A). Adicionalmente se hizo una doble tinción para actina y ZO-1 con el fin de evaluar la formación del anillo apical de actina, que es una característica clásica de células bien polarizadas y además refleja la existencia de una interacción adecuada entre el citoesqueleto de actina y proteínas de las uniones intercelulares. La monocapa de células de la línea celular 786-O transfectada con VHL era de un grosor considerable (ver Fig. 9), observándose dos planos de distribución de actina bien diferenciados: la capa superior que correspondía al anillo cortical de actina, y que colocalizaba con ZO-1 (Fig. 10B) y la inferior donde se observaban abundantes fibras de actina organizadas de forma regular. En las células 786-O VHL negativas, no se observó el anillo de actina, y sólo se apreciaba un plano de fibras de actina mínimamente organizadas (Fig. 10B). En estas mismas células se observó también una organización de ZO-1 interrumpida con espacios vacíos ocasionales (Fig. 10B, ver las flechas). Las uniones ocluyentes controlan la difusión de soluciones y líquido entre células epiteliales vecinas. El aumento de la permeabilidad paracelular es por lo tanto una consecuencia lógica de la desorganización de uniones ocluyentes (Matter and Balda 2003). Un método extensamente aceptado para evaluar la integridad de uniones ocluyentes es medir la habilidad de una solución de dextrano marcado con fluoresceína de pasar a través de una monocapa de células confluentes (Matter and Balda 2003). Los resultados de nuestros experimentos mostraron que las diferentes líneas celulares VHL negativas (786-O, RCC4 y RCC10) eran más permeables que sus correspondientes parejas transfectadas con VHL (Fig. 10C).



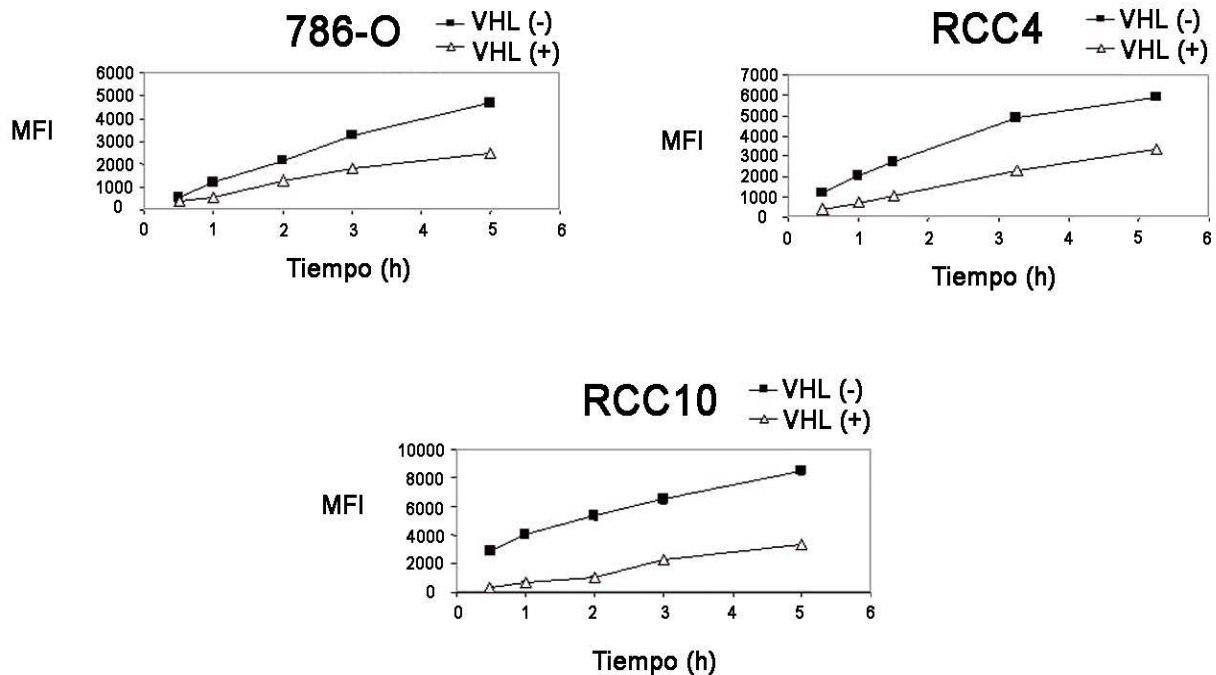
A



B



C



**Figura 10. Efecto de la inactivación de VHL en la asociación de ZO-1 con el citoesqueleto de actina y la permeabilidad celular en las células RCC.** (A) Lisados totales y fracciones insolubles de células 786-O VHL positivas y VHL negativas analizadas por Western blot con anticuerpos frente a ZO-1 y  $\beta$ -catenina. (B) Análisis mediante microscopía de fluorescencia convencional de células 786-O. Las células se crecieron hasta confluencia sobre cristales de inmunofluorescencia de 4 a 6 días y se tiñeron con un anticuerpo frente a ZO-1 y faloidina. (C) Análisis comparativo entre la permeabilidad paracelular de las líneas celulares RCC VHL positivas y VHL negativas. Células RCC (entre  $10^4$  y  $1,5 \cdot 10^4$  dependiendo del tipo celular) se crecieron en *transwell* durante 2 a 4 días. La capacidad del dextrano-FITC para pasar a través de la monocapa se analizó midiendo la intensidad de fluorescencia en el medio a los tiempos indicados. Se muestra un experimento representativo de tres analizados, siendo los puntos una media de tres pocillos independientes (MFI, media de la intensidad de fluorescencia).

### 1.3 La adquisición de morfología fibroblástica y la rotura de uniones intercelulares en células RCC VHL negativas es independiente de la expresión de HIF $\alpha$ .

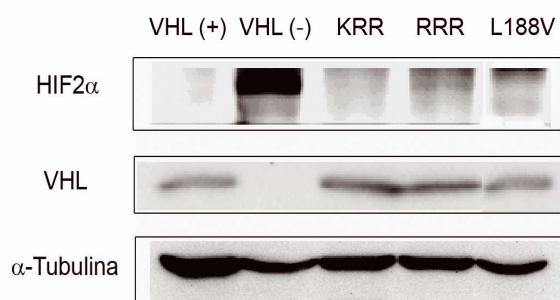
Nuestros resultados han mostrado la implicación de VHL en la diferenciación del epitelio renal en los diferentes tipos celulares analizados, así como su implicación en la

formación adecuada de uniones intercelulares. Por tanto estos resultados sugieren que estos dos fenómenos estarían relacionados. Sin embargo una cuestión importante sería cómo o cuál sería el mecanismo implicado mediante el cual VHL regula estos efectos en la organización de uniones intercelulares y en la morfología de las células. Dado que HIF $\alpha$  es una diana conocida de VHL y por otro lado se ha establecido una conexión directa entre HIF $\alpha$  y a formación de tumores renales, decidimos estudiar el papel de HIF $\alpha$  en estos efectos mediados por VHL. Para ello, utilizamos varios enfoques diferentes. Primero, se utilizó la línea celular 786-O transfectada con formas mutantes de VHL bien caracterizadas, entre ellas formas mutadas con la mutación de VHL de tipo 2C L188V, las cuales regulaban HIF $\alpha$  de forma normal, (Clifford, Cockman et al. 2001; Hoffman, Ohh et al. 2001), y otras dos mutaciones que afectaban al dominio de nedilación, que es una modificación post-traducciona parecida a la ubiquitinación pero a través de la incorporación de una proteína llamada NEDD8, denominadas VHL (RRR), en la cuál las lisinas (K) 159, 171, y 196, habían sido sustituidas por argininas (R) y las VHL (KRR) que tenía mutada únicamente la lisina 171 y 196 y se comportaban como las transfectadas con VHL normal, siendo por tanto un control para las RRR. La expresión de VHL se verificó en las tres líneas celulares (L188V, en RRR, y en KRR) mediante Western blot (Fig. 11A). En estos mutantes se analizaron los niveles de HIF 2 $\alpha$ , siendo estos indetectables en comparación con las células 786-O parentales que no expresan VHL (Fig. 11A). Como control adicional, se analizó la expresión de PHD3 (un gen diana de HIF-2 $\alpha$ ) (del Peso, Castellanos et al. 2003) mediante RT-PCR cuantitativa. La ausencia de expresión del gen de la PHD3 en L188V, RRR, y en KRR, en comparación con células 786-O parentales indicaba la ausencia de actividad o una actividad muy reducida de la transcripción de HIF $\alpha$  en estas células (Fig. 11B). El análisis de la morfología de estos mutantes mediante microscopía de contraste de fases mostraba unas células con una forma indiferenciada comparadas con las que expresan VHL salvaje. Además de estos cambios en la morfología, observamos que la monocapa de células con la mutación RRR estaba bastante desorganizada en comparación con el control KRR y con la organización de la monocapa en las células que expresan VHL salvaje (Fig. 11C, panel superior). El análisis de la doble tinción con  $\beta$ -catenina y ZO-1 mediante microscopía confocal (se representan sólo las imágenes horizontales que corresponden a la suma de secciones de toda la monocapa) mostraba líneas discontinuas y mal definidas en el mutante L188V en comparación con las células que expresaban el VHL salvaje. Las imágenes del mutante RRR no eran tan

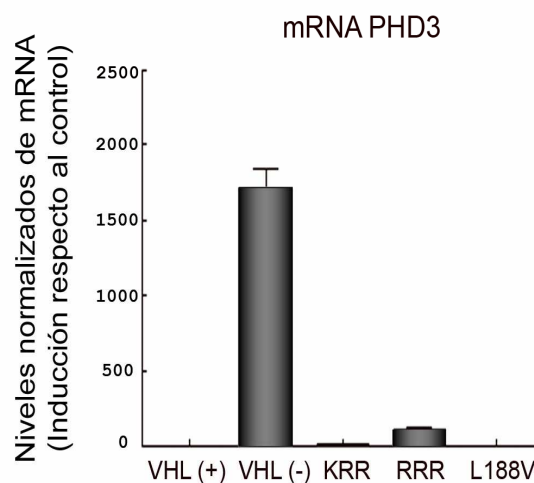
## RESULTADOS

deficientes como en células VHL negativas pero más discontinuas y difusas comparadas con el control KRR (Fig. 11C, panel inferior). Estos resultados nos indicaban que la normalización de HIF 2 $\alpha$  en células RCC 786-O no era suficiente para restaurar el fenotipo epitelial diferenciado o para la formación adecuada de las uniones intercelulares. Por otro lado indicaban que la modificación de VHL mediante nedilación parece ser importante tanto para el mantenimiento de la morfología celular como para la formación de uniones intercelulares.

A

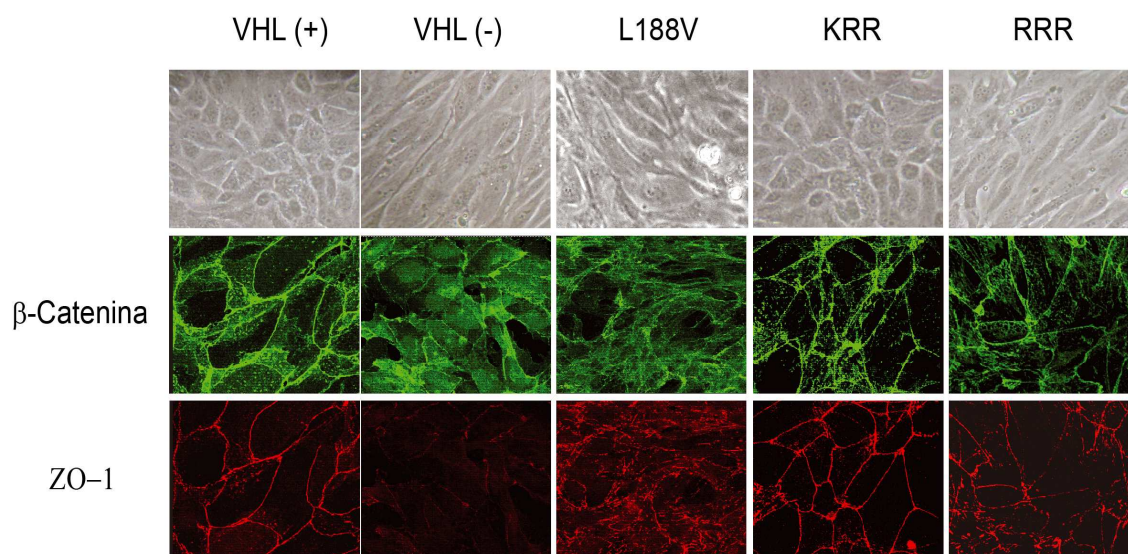


B





C



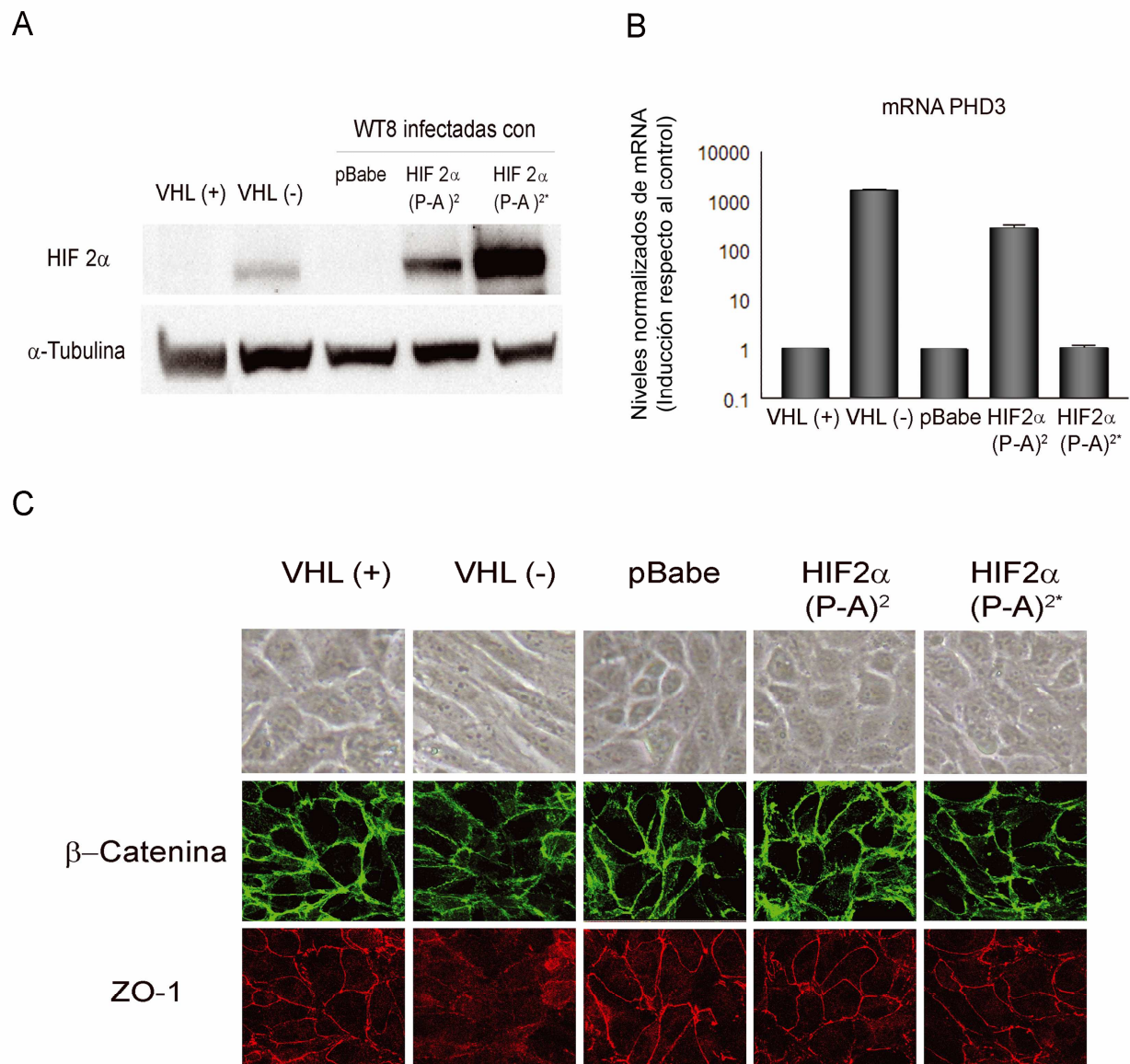
**Figura 11. La expresión de mutantes VHL de tipo 2C o de mutantes en los dominios de nedilación no rescata la organización de las uniones ocluyentes y adherentes en las células.** (A) Análisis mediante Western blot de los niveles de proteína de HIF2 $\alpha$  y VHL en lisados totales de células 786-O parentales y subclones de las mismas que expresan de forma estable VHL salvaje o las diferentes formas mutadas de VHL (L188V, KRR y RRR). (B) Análisis mediante RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de PHD3. C) Las mismas líneas celulares se crecieron hasta confluencia durante 3 a 6 días sobre cristales de inmunofluorescencia, se fijaron y se analizó su morfología mediante microscopía de contraste de fases (panel superior). Mediante microscopía confocal se analizaron secciones horizontales de estas mismas células tras su tinción con anticuerpos frente a  $\beta$ -catenina (en verde) y a ZO-1 (en rojo) (paneles inferiores). Se muestra un experimento representativo de varios analizados.

Por último, y para verificar la independencia de HIF $\alpha$  en estas modificaciones fenotípicas, se infectaron las células 786-O transfectadas de forma estable con VHL salvaje, con un retrovirus que codificaba para una forma constitutivamente activa de HIF 2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$  P405A;P531A), en la cual dos de las prolinas esenciales para el reconocimiento de VHL (P405 y P531) habían sido mutadas por alaninas (P405A y P531A) (Kondo, Kim et al. 2003). Como controles de nuestras infecciones, utilizamos el vector vacío (pBabe) y una versión de HIF 2 $\alpha$  que contiene además de las sustituciones de P405A y P531A una tercera sustitución de un aminoácido en el dominio bHLH (de “helix-loop-helix”) de HIF 2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$  P405A;P531A;bHLH\*), que tiene como resultado la pérdida de la capacidad de unión al DNA y por tanto la pérdida de la actividad

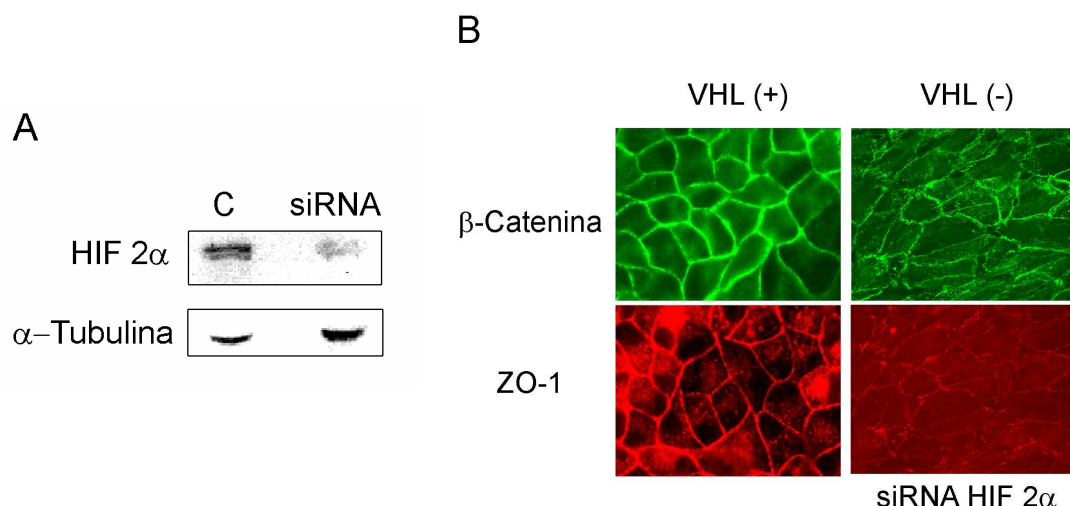
transcripcional. Los niveles de expresión de ambas construcciones tras la infección se analizaron mediante Western blot para compararlos con los niveles de expresión de las células de partida y con los de las células parentales que no expresan la proteína (Fig. 12A). Como control funcional de la expresión de estos mutantes se analizaron los niveles de mensajero mediante RT-PCR cuantitativa de una de sus dianas mejor caracterizadas, la PHD3. El mutante HIF 2 $\alpha$  P405A;P531A mostró niveles de PHD3 similares a los observados en las VHL negativas, indicando por tanto que el mutante tenía actividad transcripcional. Esto no ocurría en las células VHL positivas infectadas con el vector vacío o en las infectadas con el mutante HIF 2 $\alpha$  P405A;P531A;bHLH\* (Fig. 12B). Las imágenes del microscopio de contraste de fases y el análisis de la doble tinción de  $\beta$ -catenina y ZO1 mediante un microscopio de fluorescencia, mostraron que, a pesar de los altos niveles de HIF 2 $\alpha$  transcripcionalmente activo, las células 786-O VHL positivas infectadas con HIF 2 $\alpha$  P405A;P531A presentaban una forma muy regular y uniones intercelulares bien organizadas (Fig. 12C).

Por otro lado interferimos la expresión de HIF2 $\alpha$  en células VHL negativas. Los niveles de expresión se analizaron mediante Western blot para compararlos con los niveles de expresión de las células de partida (Fig. 13A). El análisis mediante microscopía de fluorescencia de  $\beta$ -catenina y ZO1 mostraron que, a pesar de la disminución de los niveles de HIF 2 $\alpha$ , las células 786-O VHL negativas no presentaban uniones intercelulares bien organizadas (Fig. 13B).

Estos resultados respaldan la hipótesis de que HIF $\alpha$  no está implicado en la formación de uniones intercelulares ni en mantener la morfología celular.



**Figura 12. La expresión de una forma constitutivamente activa de HIF2 $\alpha$  en células 786-O VHL positivas no afecta a la organización de las uniones ocluyentes y adherentes.** (A) Análisis mediante Western blot de los niveles de proteína de HIF2 $\alpha$  en lisados totales de células 786-O transfectadas con la forma salvaje de VHL (WT8), con el plásmido vacío (PRC3), con el vector retroviral vacío (pBabe) o con las construcciones retrovirales HIF-2 $\alpha$  P405A; P531A [HIF-2 $\alpha$  (P-A)2] y HIF-2 $\alpha$  P405A; P531A; bHLH\* [HIF2 $\alpha$  (P-A)2\*]. (B). Los niveles de mRNA de PHD3 de estos mismos tipos celulares se analizaron mediante RT-PCR cuantitativa. (C) Análisis mediante microscopía de contraste de la morfología celular de fases (panel superior) y análisis mediante microscopía confocal de fluorescencia de la expresión de  $\beta$ -catenina (verde) y ZO-1 (rojo) en secciones horizontales.(paneles inferiores). Se muestra un experimento representativo de varios analizados.



**Figura 13. La disminución de la expresión de HIF2 $\alpha$  en células 786-O VHL negativas no afecta a la organización de las uniones ocluyentes y adherentes.** (A) Análisis mediante Western blot de los niveles de proteína de HIF2 $\alpha$  en lisados totales de células control y células interferidas para HIF2. (B) Análisis mediante microscopía confocal de fluorescencia de la expresión de  $\beta$ -catenina (verde) y ZO-1 (rojo) en secciones horizontales. Se muestra un experimento representativo de varios analizados.

#### 1.4 El bloqueo de la formación de matriz de fibronectina no altera la citoarquitectura epitelial en células 786-O transfectadas con VHL salvaje.

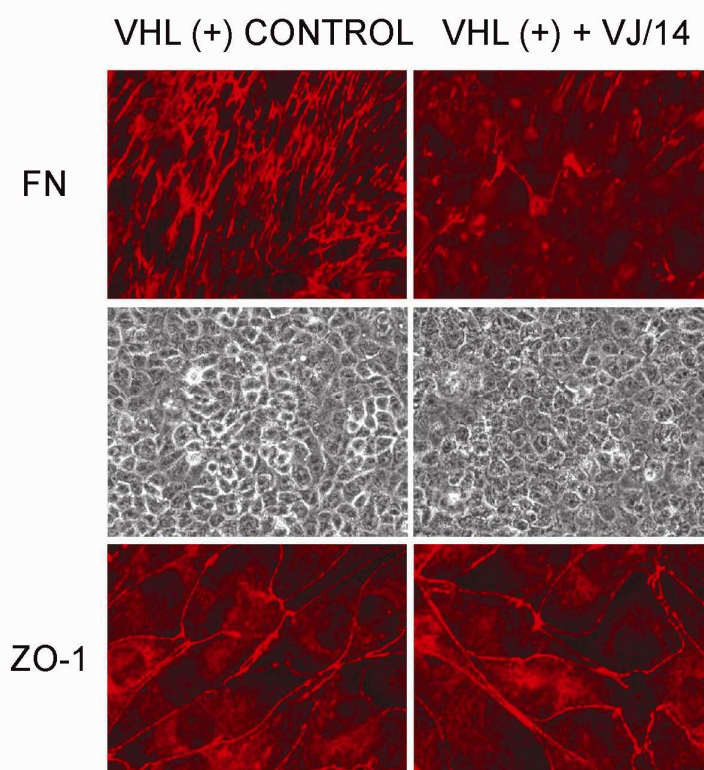
Como hemos descrito anteriormente, los mutantes 786-O RRR y L188V a pesar de regular HIF $\alpha$  de forma normal, presentaban una morfología alargada y defectos en la correcta organización de uniones intercelulares. Estudios previos con estos mutantes muestran que ambos presentan un defecto en la formación de matriz de fibronectina extracelular (Hoffman, Ohh et al. 2001; Stickle, Chung et al. 2004). Dado que la formación de matriz extracelular se ha visto implicada en múltiples aspectos del comportamiento de la célula, incluidos la proliferación celular, la susceptibilidad a la apoptosis, y la conservación de la citoarquitectura del tejido (Robinson, Foty et al. 2004), pensamos que en células RCC, la rotura de la matriz de fibronectina podría estar perturbando la organización de uniones y la morfología celular. Para evaluar esto, cultivamos células 786-O transfectadas con VHL salvaje en presencia de un anticuerpo que bloqueaba la integrina



$\beta 1$  (VJ1/14); que junto con la subunidad  $\alpha 4$  o  $\alpha 5$  constituye el heterodímero que funciona como receptor de fibronectina (Danen, Sonneveld et al. 2002; Moyano, Maqueda et al. 2003). En presencia de este anticuerpo se bloquea la unión de la fibronectina soluble a su receptor en la superficie de la membrana celular y por tanto el ensamblaje de la matriz. Sin embargo, aunque la formación de matriz de fibronectina extracelular en células de 786-O transfectadas con VHL se suprimió dramáticamente, su organización en monocapa, la formación de uniones ocluyentes (Fig. 14), y la permeabilidad paracelular no se vieron afectadas en gran medida. Estos resultados sugerían que la ausencia de una matriz de fibronectina no podía explicar las modificaciones en la citoarquitectura de células VHL negativas.

**Figura 14. Efecto de bloquear el ensamblaje de matriz de fibronectina en el fenotipo epitelial de las células RCC 786-O VHL positivas.** Análisis mediante microscopía de contraste de fases y microscopía de fluorescencia de la morfología celular, del ensamblaje de fibronectina y de la integridad de las uniones intercelulares. Las células, 786-O VHL positivas, se cultivaron durante 4-5 días en cristales de inmunofluorescencia en ausencia o en presencia de un anticuerpo monoclonal bloqueante de la integrina  $\beta 1$  (VJ1/14, 20  $\mu\text{g/mL}$ ). Las muestras se fijaron y analizaron previa tinción, para

analizar la morfología, o tras incubación con anticuerpos frente a fibronectina y ZO-1. Se analizaron varios campos en experimentos independientes. Se muestra una imagen representativa de los resultados



## **2.- VHL es necesario para la correcta formación de matriz de FN en células de carcinoma renal humano (RCCs).**

### **2.1 Los niveles de expresión de FN en células de carcinoma renal y en sus revertientes transfectadas con VHL no se correlacionan con la capacidad de estas células para ensamblar una matriz de FN.**

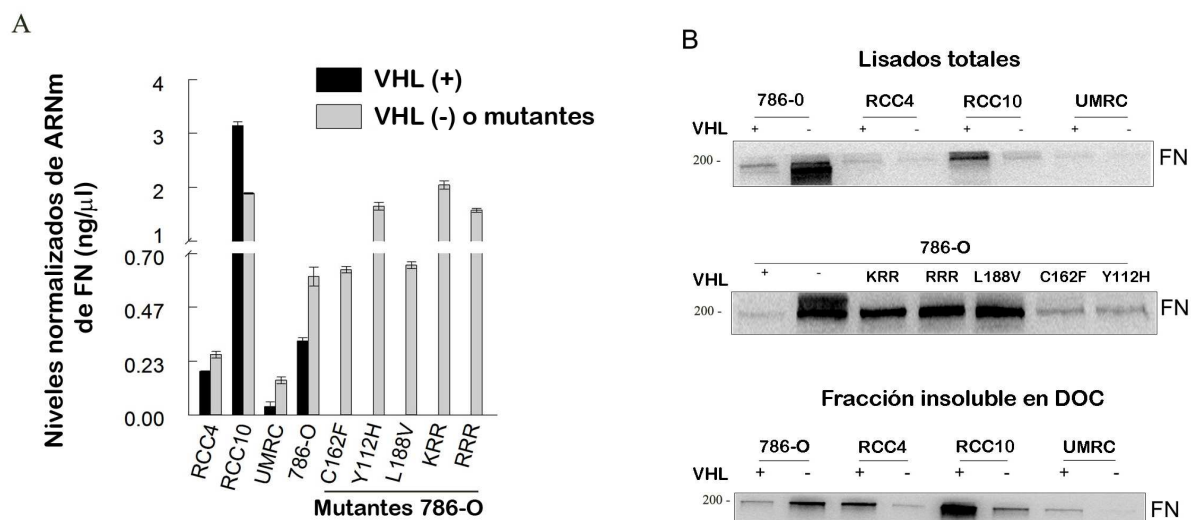
Estudios previos en células de carcinoma renal en los que se analizó la deposición de fibronectina en la matriz extracelular (medida tanto por inmunofluorescencia como por enzimoimmunoensayo) sugerían la incapacidad de estas células para formar un entramado de matriz de fibronectina (Ohh, Yauch et al. 1998; Clifford, Cockman et al. 2001; Esteban-Barragan, Avila et al. 2002). Una posible explicación a este fenómeno podría ser debida a una producción anómala de la proteína o a una secreción deficiente de la misma (Bluyssen, Lolkema et al. 2004; He, Liu et al. 2004). Para determinar si esto es un fenómeno general en las células RCC, analizamos los niveles de expresión de la FN, tanto de los niveles de RNA mensajero como de la proteína, en diferentes líneas celulares de carcinoma renal y en células con diferentes mutaciones en la proteína VHL, que se correspondían con los diferentes fenotipos de la enfermedad (tipo 2A, 2B y 2C). Estas mutaciones incluían los mutantes Y112H (tipo 2A), C162F (tipo 2B), y las anteriormente estudiadas para la mutación de tipo 2C (L188V y RRR), todas ellas generadas en el background de las células 786-O. Los niveles de RNA mensajero de fibronectina analizados mediante PCR cuantitativa fueron significativamente menores en las células 786-O y UMRC VHL negativas con respecto a sus revertientes correspondientes VHL positivas (Fig. 15A). Es interesante destacar que los niveles de RNA mensajero de algunos de los mutantes de VHL, que como se demuestra en este trabajo son incapaces de formar una matriz adecuada de FN, fueron más altos que aquellos expresados por células 786-O con VHL salvaje (Fig. 15A). Por el contrario, las células RCC10 VHL positivas expresaban unos niveles de RNA mensajero mayores que las células parentales VHL negativas (Fig. 15A).

El análisis de los niveles de expresión de la proteína en lisados celulares y en fracciones insolubles de deoxicolato en los mismos tipos celulares, indicaron que en concordancia con los datos de RNA mensajero, las células VHL parentales y los mutantes de VHL expresaban niveles más elevados de proteína con respecto a las células transfectadas con VHL salvaje (Fig. 15B). La mayor cantidad de fibronectina encontrada en la fracción insoluble de deoxicolato de las células VHL parentales podría ser debida a una mayor retención de la misma en el citoplasma celular debido a que podría estar interaccionando con otras proteínas del citoesqueleto. Por el contrario, las células RCC4, RCC10 y UMRC parentales expresan menor cantidad de fibronectina que sus revertientes transfectadas con VHL salvaje, tanto en los lisados totales como en la fracción insoluble de deoxicolato (Fig. 15B). Además, nuestros resultados mostraban que los niveles de RNA mensajero y los niveles de proteína no siempre correspondían. Una posible explicación a estas diferencias sería en parte debida a que los niveles de proteína se midieron en lisados celulares totales y se descartó parte de la fibronectina que se secreta al sobrenadante celular. Sin embargo, las medidas de la proteína presente en el sobrenadante de células VHL (+) y VHL (-) indicaron que los niveles eran similares.

Aunque estos resultados anteriores nos indican que el problema en el defecto de ensamblaje de matriz de fibronectina no parecía radicar en los niveles de expresión de la misma, decidimos comprobar si en presencia de fibronectina exógena las células VHL (-) y los mutantes revertían su comportamiento. En estudios previos del laboratorio con la línea 786-O se mostraba que en presencia de fibronectina exógena la células VHL (-) no reestablecían el ensamblaje FN (Esteban-Barragan, Avila et al. 2002). Nosotros quisimos corroborar estos datos y ampliar este estudio al resto de las líneas celulares utilizadas en nuestro trabajo. Para ello analizamos el ensamblaje en tres líneas de carcinoma renal, RCC4, RCC10 y UMRC y en los mutantes ya descritos. Nuestros resultados confirmaron que tanto las células VHL (-) como los diferentes mutantes eran incapaces de formar fibras de fibronectina visibles, confirmando por tanto que la disponibilidad de fibronectina no es exclusivamente responsable de la capacidad de las células de formar una matriz (Fig. 16A-B).

Cabe destacar que las células UMRC VHL (+) sólo ensamblaban una matriz de fibronectina cuando se le añade fibronectina exógena, por tanto en este caso en particular,

la ausencia o la baja secreción de fibronectina sería la responsable de la pérdida del ensamblaje de la matriz de fibronectina (ver fig. 15A y B). En conclusión, estos resultados indican que existe una expresión heterogénea en la producción de fibronectina en las diferentes líneas de carcinoma renal VHL (+) y VHL (-) y lo más importante es que la pérdida del ensamblaje de la matriz de fibronectina en células VHL (-) no siempre se puede atribuir a los niveles de expresión de la misma.



**Figura 15. Estudio comparativo de los niveles de expresión de fibronectina en diferentes líneas de carcinoma renal VHL (+) y VHL (-).** (A) Análisis mediante RT-PCR cuantitativa de los niveles de ARN mensajero en las líneas 786-O, RCC4, RCC10 y mutantes de VHL. Se representa el número de copias en ng/μl extrapolado de su correspondiente curva estándar. Los resultados se corrigieron con respecto a la cantidad de actina y. se hizo una media de tres experimentos independientes ( $p < 0.05$ ). (B) Análisis mediante Western blot de los niveles de fibronectina exógena en las distintas líneas celulares. Los lisados totales o las fracciones insolubles de deoxicolato se revelaron con un anticuerpo policlonal anti-fibronectina. Se muestra un experimento representativo.



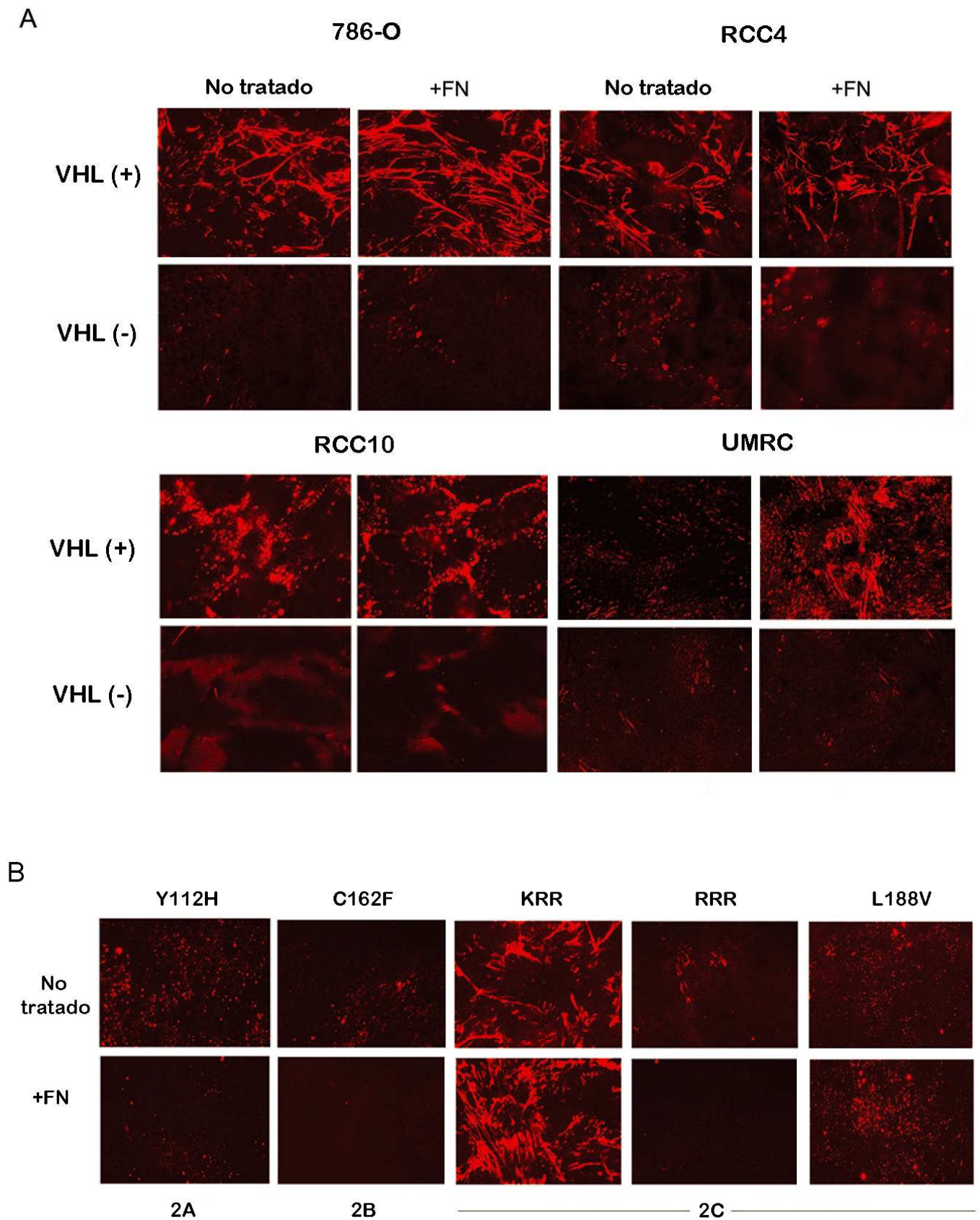


Figura 16. Análisis de la formación de la matriz de fibronectina en células de carcinoma renal y en los mutantes de VHL en presencia de fibronectina exógena. (A) Las diferentes líneas celulares (786-O,

RCC4, RCC10 y UMRC VHL (+) y (-) se crecieron a confluencia en presencia o ausencia de fibronectina exógena. (10µg/ml). Después de 3 ó 4 días, las células se lisaron y se analizó la formación de la matriz de fibronectina por inmunofluorescencia con un anticuerpo policlonal anti-fibronectina. (B) Los mutantes de tipo 2A (Y112H), 2B (C12F) y 2C (L188V, RRR y su control KRR) se crecieron en las mismas condiciones que en el apartado A, y se analizó la formación de la matriz de fibronectina después de 3-4 días en cultivo. Las imágenes que se muestran son imágenes representativas de, al menos, tres experimentos independientes.

### **2.2 La Fibronectina producida por las células VHL (-) es funcional y capaz de ensamblarse en fibras para formar una matriz.**

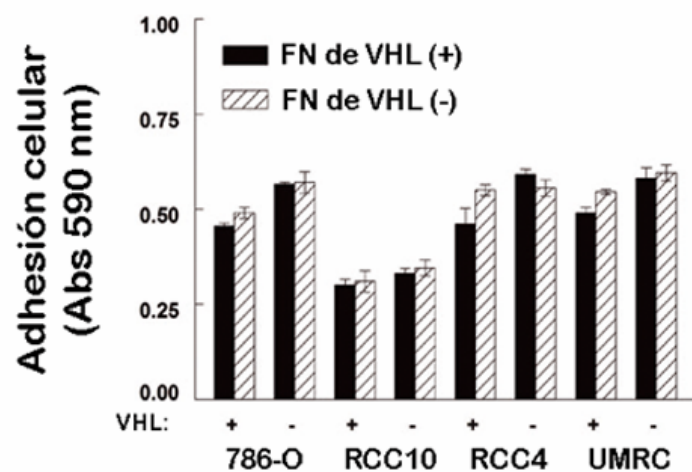
Si la producción y la secreción de la fibronectina no explica el defecto en su ensamblaje en las células VHL (-), existe la posibilidad de que la fibronectina producida por estas células que han perdido VHL sea una fibronectina anómala que no es funcional y por tanto no puede ser ensamblada. Con el fin de demostrar nuestra hipótesis hemos estudiado si la fibronectina producida por las células VHL (-) es capaz de promover adhesión celular, con lo cual se uniría de forma eficiente a sus receptores en la membrana celular (integrinas  $\alpha 5\beta 1$  o  $\alpha 4\beta 1$ ), y por otro lado si puede ser ensamblada por células que expresan VHL. Para ello, se realizaron experimentos de adhesión usando fibronectina purificada del sobrenadante de células VHL (+) y células VHL (-).

Como se muestra en la figura 17A, todas las líneas celulares mostraron niveles de adhesión similares, tanto a la fibronectina purificada de células VHL (+) como a la purificada de VHL (-). Estos resultados indican por tanto que la fibronectina sintetizada por las células VHL (-) es capaz de mediar la adhesión celular de forma tan eficiente como la fibronectina sintetizada por las células VHL (+). Además, estos resultados demuestran que la pérdida del ensamblaje de fibronectina por las células VHL (-) no se debe a una disminución de la actividad de receptores.

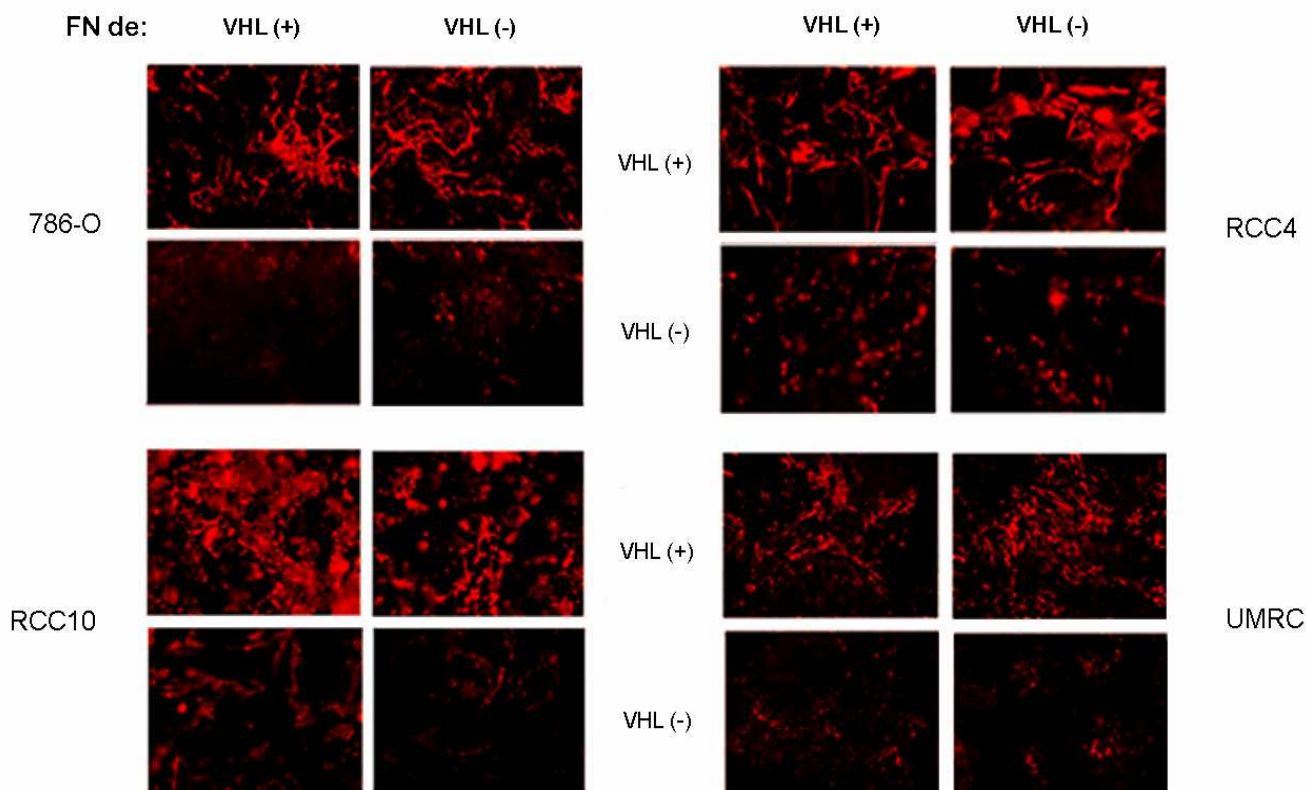
Los experimentos de ensamblaje realizados con la fibronectina purificada de células VHL (+) y VHL (-) confirmaron que las células VHL (-) no ensamblan una matriz de fibronectina, ni siquiera en presencia de fibronectina exógena purificada del sobrenadante de células VHL (+) (Fig. 17B). Por el contrario, las células VHL (+) son capaces de formar una matriz de fibronectina cuando se le añade tanto fibronectina

purificada del sobrenadante de células VHL (+) como de células VHL (-) (Fig. 17B). Para poder distinguir entre el ensamblaje de la fibronectina endógena y exógena, usamos la línea celular UMRC VHL (+), que como ya hemos mencionado producen niveles muy bajos de fibronectina, y sólo pueden ensamblarla cuando se les añade fibronectina exógena (ver Fig. 16A). Estos experimentos mostraron que estas células, eran capaces de ensamblar tanto la fibronectina purificada del sobrenadante de células VHL (+) y como la de las VHL (-) (Figura 17B). Por tanto podemos concluir que la fibronectina producida por las células VHL (-) es completamente funcional y capaz de ser ensamblada por las células VHL (+).

**A**



B



**Figura 17. Evaluación de la funcionalidad de la fibronectina purificada de células de carcinoma renal VHL (+) y VHL (-).** (A) La adhesión celular sobre fibronectina purificada del sobrenadante de células VHL (+) y células VHL (-) se analizó incubando las células ( $2 \times 10^4$  células/pocillo) durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  en placas de 96 pocillos previamente recubiertos con FN ( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ). Las células se fijaron y tiñeron con cristal violeta. Las células adheridas se cuantificaron midiendo la absorbancia a 590 nm. Como control negativo se utilizó BSA. En la gráfica se representa la media de tres experimentos independientes. (B) Análisis del ensamblaje de fibronectina mediante inmunofluorescencia. Se plaquearon  $2 \times 10^5$  células de las líneas 786-O, RCC4, RCC10 y UMRC sobre cristales previamente recubiertos o no con FN ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) purificada del sobrenadante de células VHL (+) y VHL (-). Tras mantener las células durante 3 ó 4 días en cultivo a  $37^\circ\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$ , la matriz formada se analizó en un microscopio de fluorescencia. Se muestra un experimento representativo de al menos cuatro realizados.

### **2.3 Las células VHL (-) son deficientes en la formación de fibras de estrés y en la contractibilidad celular.**

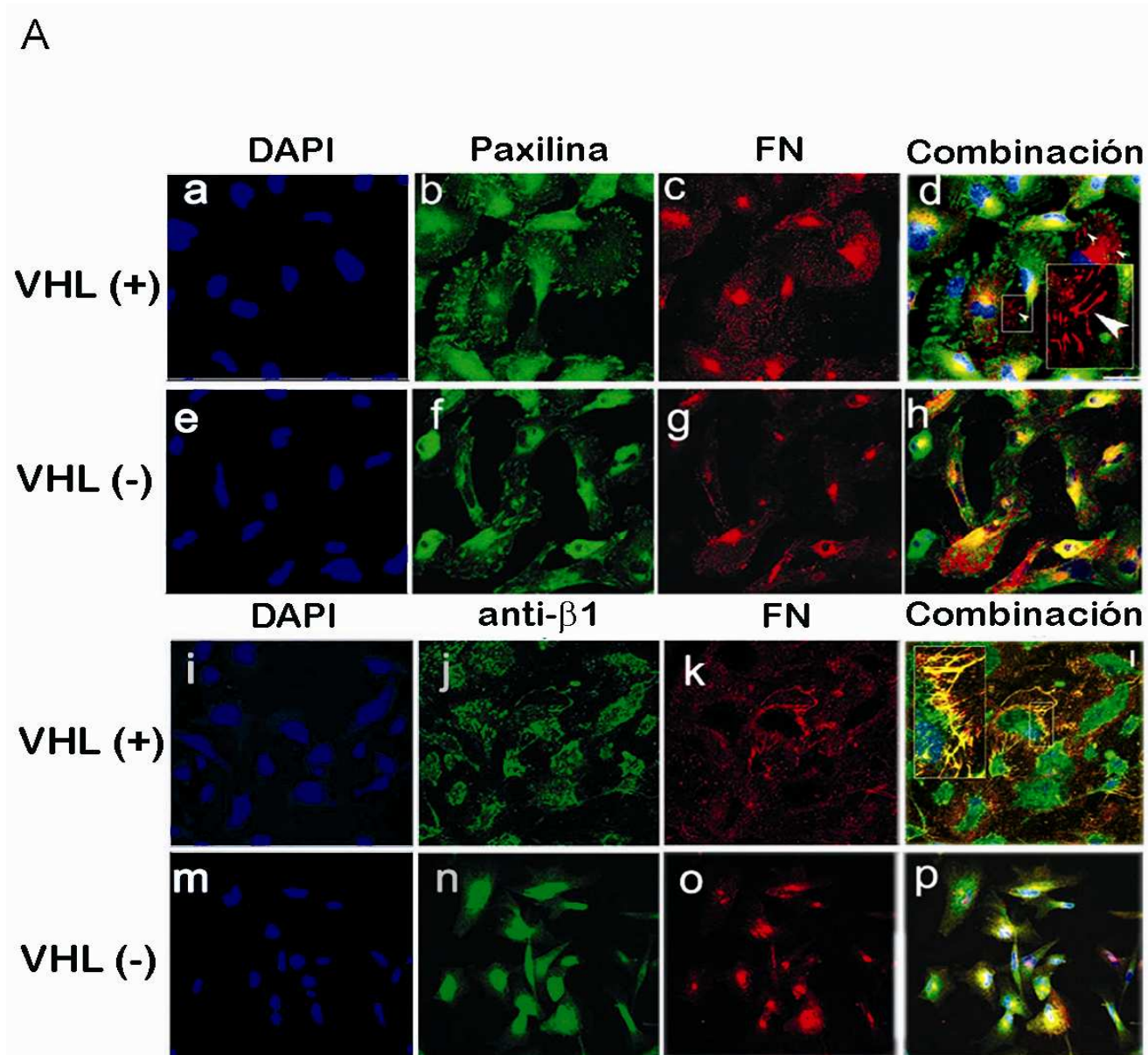
Estudios previos del laboratorio mostraron que las células VHL (-) no forman adhesiones fibrilares  $\beta 1$  adecuadas (Esteban-Barragan, Avila et al. 2002). Por otro lado la ausencia de fibras de estrés de actina y la pérdida de contractibilidad celular son eventos necesarios para exponer los sitios críticos de la fibronectina y su organización en fibras insolubles (Zhang, Magnusson et al. 1997). Por tanto, un defecto en estos mecanismos celulares en las células VHL (-) podría explicar el defecto de estas células para ensamblar fibronectina. Para estudiar este proceso, analizamos por microscopia confocal la formación de contactos focales a las 4 horas de cultivo tras teñir las células con anticuerpos anti-paxilina y anti-fibronectina. Estos experimentos se hicieron en presencia de fibronectina exógena, dado que al realizarse a tan sólo 4 h. la fibronectina producida por las células no sería suficiente para poder ver este proceso. Los resultados mostraron que las células VHL (+) formaban contactos focales eficientes y además se empezaban a ver pequeños haces de fibras de fibronectina ( Fig. 18, panel c y d, puntas de flecha blancas). Sin embargo, observamos que las células VHL (-) a pesar de ser capaces de formar contactos focales, su eficiencia era menor y el número de los mismos también estaba notablemente disminuido (Fig. 18A, paneles f-h y B).

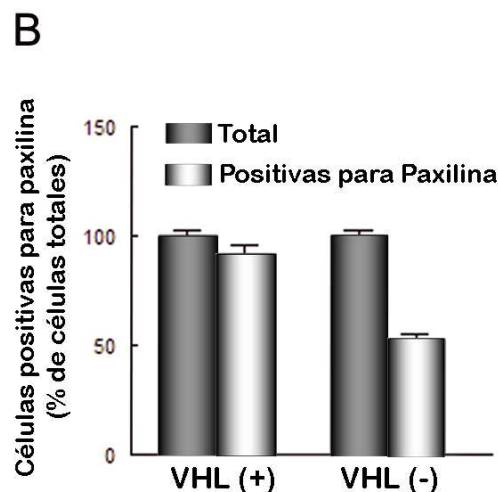
Estos resultados por tanto apoyan la idea de que el defecto en la formación de contactos focales podría afectar a la formación de adhesiones fibrilares necesarias para el ensamblaje de fibronectina. Tras 24 horas de mantener las células en cultivo estas adhesiones fibrilares se convertía en estructuras maduras más organizadas que colocalizaban con los haces de fibronectina en las células VHL (+) (Fig. 18, paneles j-l, ver la zona aumentada). Por el contrario, en las células VHL (-) no se formaban estas adhesiones fibrilares ni aparecían fibras de fibronectina, ni siquiera en presencia de fibronectina exógena. (Fig. 18, paneles n-p).

Estos resultados, junto con el hecho de que las células VHL (-) presenten una menor organización de fibras de estrés de actina (Calzada, Esteban et al. 2006), apoyan nuestra hipótesis de que la pérdida de ensamblaje de fibronectina, en células VHL (-)



podría tener que ver con que estas células no son capaces de desplegar la fibronectina para exponer sus sitios críticos y por tanto no se une a otras moléculas de fibronectina y no se produce el ensamblaje.





**Figura 18. Formación de contactos célula-matriz y ensamblaje de fibrillas de FN en células VHL (+) y VHL (-).** (A) Se analizaron los contactos focales y fibrilares mediante tinción con anticuerpos frente a paxilina (paneles b, f, d y h) y frente a integrina  $\beta 1$  activada (paneles j, n, l y p) incubando simultáneamente con anticuerpo anti-fibronectina (paneles c, g, d, h, k, o, l y p) para detectar la formación de fibrillas. Se plaquearon células 786-O VHL (+) y VHL (-) sobre cristales previamente tratados con 20 $\mu$ g/ml de fibronectina y se mantuvieron en cultivo durante 4 y 24 horas. Las células se fijaron, se permeabilizaron y posteriormente se tiñeron con DAPI (paneles a, e, i y m) y con los anticuerpos indicados. La formación de contactos célula-matriz y el ensamblaje de fibrillas de FN se analizó mediante microscopía confocal. Se analizaron al menos 6 campos diferentes en experimentos independientes mostrándose un experimento representativo (barra 25 $\mu$ M, zoom3x). (B) Cuantificación de células positivas para paxilina. Se contaron al menos 10 células por campo en tres experimentos independientes. Los resultados se normalizaron frente al porcentaje de células totales.

## 2.4 La activación de la GTPasa RhoA es deficiente en células VHL (-).

Estudios previos demuestran que la proteína RhoA, de la familia de las GTPasas pequeñas, media la formación de fibras de estrés de actina y regula funciones celulares como adhesión celular y contractibilidad (Ridley 2001). Además, en presencia de inhibidores de la contractibilidad celular mediada por RhoA se impide la formación de fibras de fibronectina (Zhong, Chrzanowska-Wodnicka et al. 1998) y por el contrario la expresión de una forma constitutivamente activa de RhoA reestablece el ensamblaje de fibronectina en células que han perdido la expresión de las integrinas  $\beta 1$  (Cali, Mazzarella et al. 1999). Teniendo en cuenta estos antecedentes hipotetizamos que la actividad y/o función de RhoA podría estar afectada en células VHL (-).

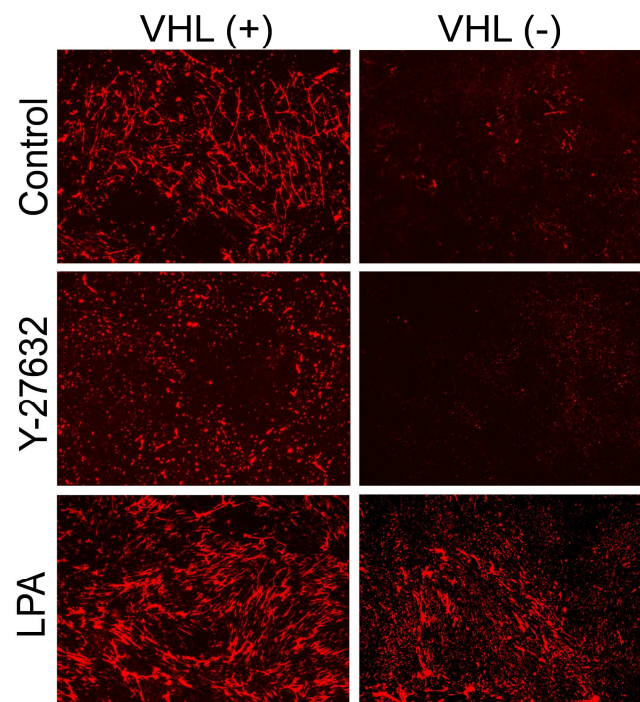
Para determinar si RhoA estaba o no directamente implicada en el ensamblaje de fibronectina en las células de carcinoma renal, se realizaron experimentos de inmunofluorescencia para analizar el ensamblaje de fibronectina producido por células 786-O VHL (+) y VHL (-) en presencia de inhibidores o activadores de la ruta de señalización de RhoA. En presencia de Y-27632 o de 2-3 BDM, que son inhibidores del efector de RhoA (ROCK), se perdía el ensamblaje de fibronectina producido por células VHL (+) (Fig. 19A). Además, la activación de RhoA por LPA provocaba un aumento en la formación de fibras de fibronectina en células VHL (+) e inducía la formación de fibrillas en células VHL (-) (Fig. 19A).

Teniendo esto en cuenta, nuestro siguiente objetivo fue analizar la actividad de RhoA en células VHL (+) y VHL (-). Para ello se hicieron experimentos de captura con la proteína de fusión C21-GST. Se analizó la actividad de RhoA en estas células a tiempo 0 y tras 72h en cultivo. El análisis de estos resultados indicó que las células RCC 786-O VHL (+) mostraban una actividad de RhoA basal que iba incrementando con el tiempo. Por el contrario las células 786-O VHL (-) o el mutante de VHL L188V mostraron una actividad basal muy baja similar en todos los tiempos analizados (Fig. 19B). En la línea celular RCC4 los niveles de RhoA eran muy bajos y no teníamos suficiente sensibilidad para analizar la fosforilación con los experimentos de captura, por tanto se analizó la actividad de RhoA mediante enzoinmunoensayo con un kit específico para medir la actividad de RhoA. Los resultados indicaron que la actividad de RhoA en las células RCC4VHL (+) era mayor que en las RCC4VHL (-) (Fig. 19C). Estos resultados por tanto sugerían que la ruta de señalización de RhoA está jugando un papel importante en las alteraciones funcionales observadas en estas células VHL (-). Además, los resultados con las células que expresan la mutación tipo 2C de VHL, que siguen teniendo capacidad de regular HIF pero no ensamblan fibronectina, indican que la actividad de RhoA en estas células parece ser independiente de HIF.



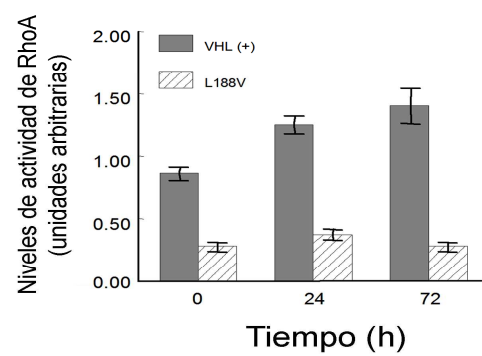
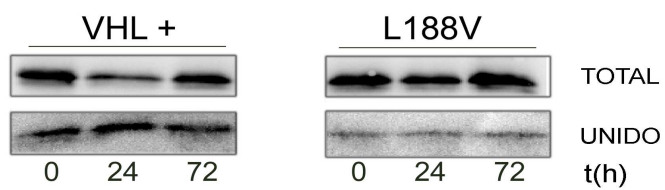
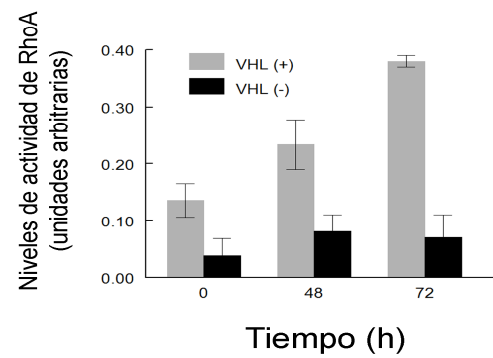
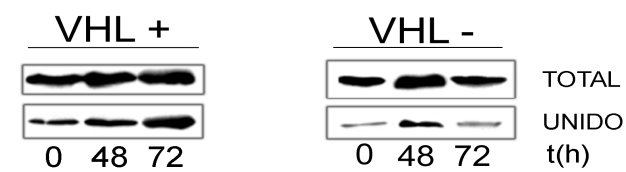
A

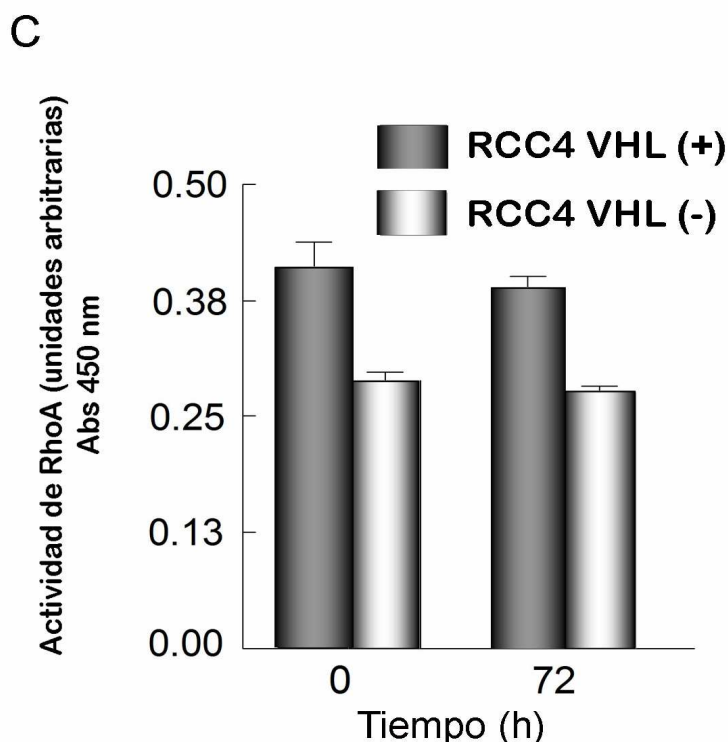
786



B

786





**Figura 19. Estado de activación de RhoA en células de carcinoma renal VHL (+) y VHL (-).** (A) Análisis mediante inmunofluorescencia de la formación de matriz de fibronectina en células 786-O en presencia o ausencia del inhibidor de la señalización de RhoA, Y27632 (5 $\mu$ M) o del activador LPA (6 $\mu$ M) tras. Las células se cultivaron durante 3 ó 4 días y el análisis del ensamblaje se realizó tal y como se ha descrito en secciones anteriores. (B) Análisis de la cantidad de RhoA total y de la proteína activada. Las células VHL (+), VHL (-) y el mutante L188V se incubaron durante tres horas en medio sin suero, como basal para los niveles de actividad de RhoA. Transcurrido este tiempo se añadió suero al medio de cultivo y se cultivaron durante 24, 48 y 72 horas. En cada uno de los tiempos, las células se lisaron e incubaron con la proteína de fusión C21-GST durante toda la noche. Se analizó por Western blot la cantidad de RhoA total y la cantidad de RhoA unido al C21-GST con un anticuerpo monoclonal anti-RhoA. En la figura se representa la cantidad de RhoA unido corregido por la cantidad de RhoA total. Las barras grises representan a las células VHL (+), las negras a las VHL (-) y las barras rayadas al mutante L188V. Se muestra un blot representativo y la cuantificación con la media de tres experimentos independientes ( $p < 0,05$ ). (C) Las células RCC4 VHL (+) y VHL (-) ( $7 \times 10^6$ ) se cultivaron durante tres horas en medio sin suero, esto se tomó como basal de actividad de RhoA. El análisis de la actividad de RhoA se hizo tras 72 horas de cultivo en medio completo. Las células se lisaron y la actividad RhoA se analizó con el kit RhoG-Elisa. En la gráfica se representa la media de tres experimentos independientes ( $P \leq 0.05$ ).

## 2.5 La activación constitutiva de RhoA estimula el ensamblaje de fibronectina en células VHL (-).

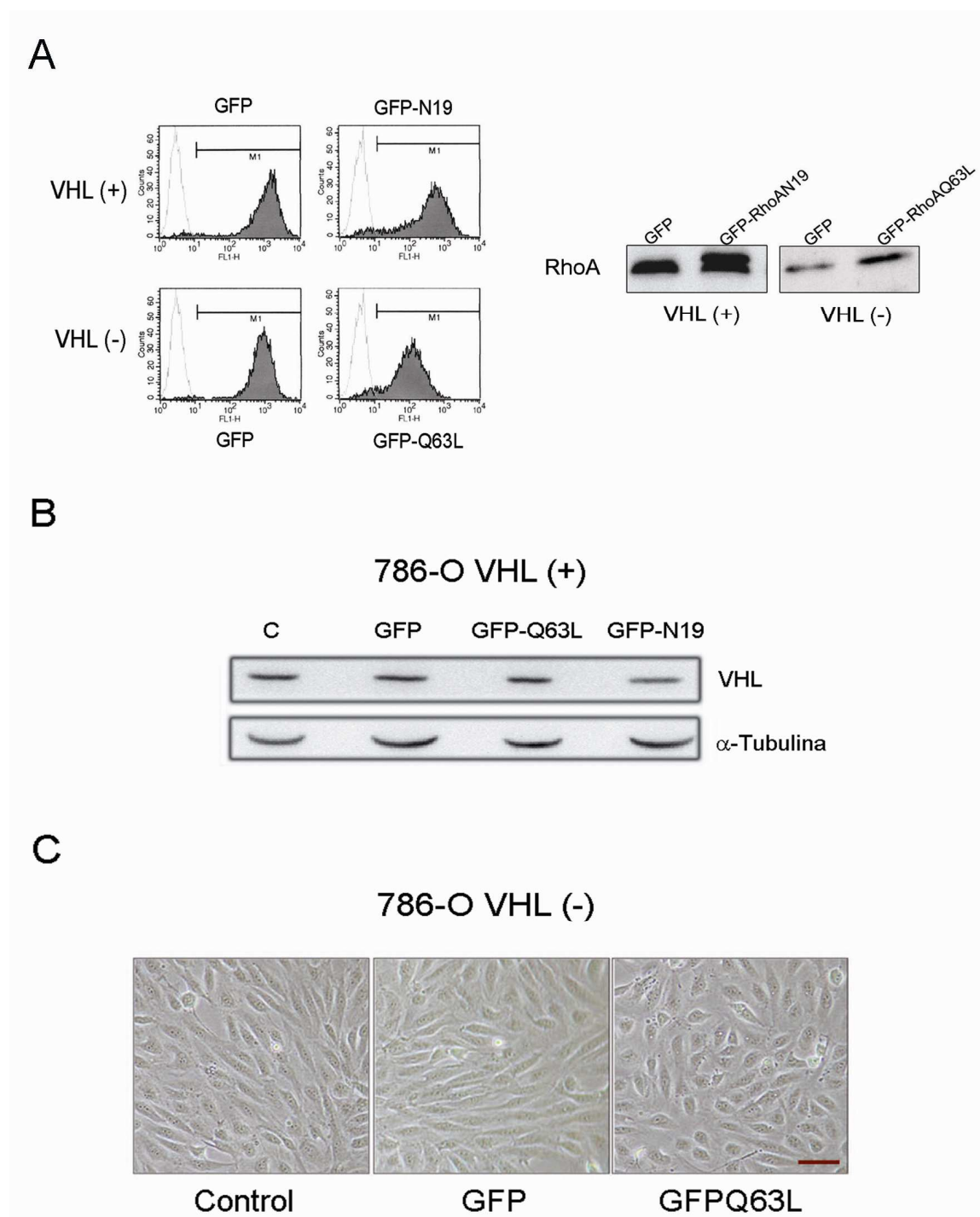
Para estudiar más en profundidad el papel de RhoA en la pérdida del ensamblaje de fibronectina en células VHL (-), utilizamos retrovirus para transducir las células VHL (+) con un dominante negativo de RhoA (GFP RhoA-N19) y las células VHL (-) con una construcción RhoA constitutivamente activa (GFP RhoA-QL). Tras la transducción se pudo comprobar que la expresión de RhoA aumentó, al menos, tres veces (Fig. 20A). Para comprobar que este proceso de infección con retrovirus no tenía efectos sobre los niveles de expresión de VHL, se analizó por Western blot la cantidad de VHL en estas células infectadas y se pudo comprobar que ninguna de las infecciones afectó los niveles de expresión de VHL en estas células (Fig. 20B). A continuación analizamos si la expresión de estas formas mutadas de RhoA inducía algún cambio morfológico en nuestras células transcurridos tres días tras la infección. El análisis microscópico nos mostraba que las células VHL (+) infectadas con el dominante negativo GFP RhoA N19 no mostraban cambios aparentes en su morfología. Sin embargo, las células VHL (-) infectadas con RhoA constitutivamente activo (GFP RhoA QL), mostraron un cambio morfológico más característico del fenotipo epitelial que presentan las células VHL (+). Estos cambios morfológicos pudieron cuantificarse midiendo las dimensiones celulares. Estas medidas indicaron que las dimensiones de las células VHL (-) tras la infección con RhoAQ63L cambiaron de unos  $70 \pm 5 \mu\text{m}$  de longitud y unos  $20 \mu\text{m}$  de ancho a  $35 \pm 10 \mu\text{m}$  de largo y  $20 \mu\text{m}$  de ancho, mientras que el vector vacío no tuvo ningún efecto (Fig. 20C).

El efecto de las infecciones en el ensamblaje de matriz de fibronectina se analizó mediante inmunofluorescencia. Los resultados de estos experimentos mostraron que el efecto de estas infecciones en las células VHL (+) GFP RhoA-N19 inducía una disminución en la formación de fibras de fibronectina en comparación con células VHL (+) o con células VHL (+) infectadas con el vector vacío (Fig. 20D, panel superior). En estas mismas células la infección con RhoA constitutivamente activo no indujo aumento alguno en formación de fibras de fibronectina. Sin embargo, en células VHL (-) infectadas con GFP RhoA QL se incrementó la formación de fibras de fibronectina al menos en un 39%

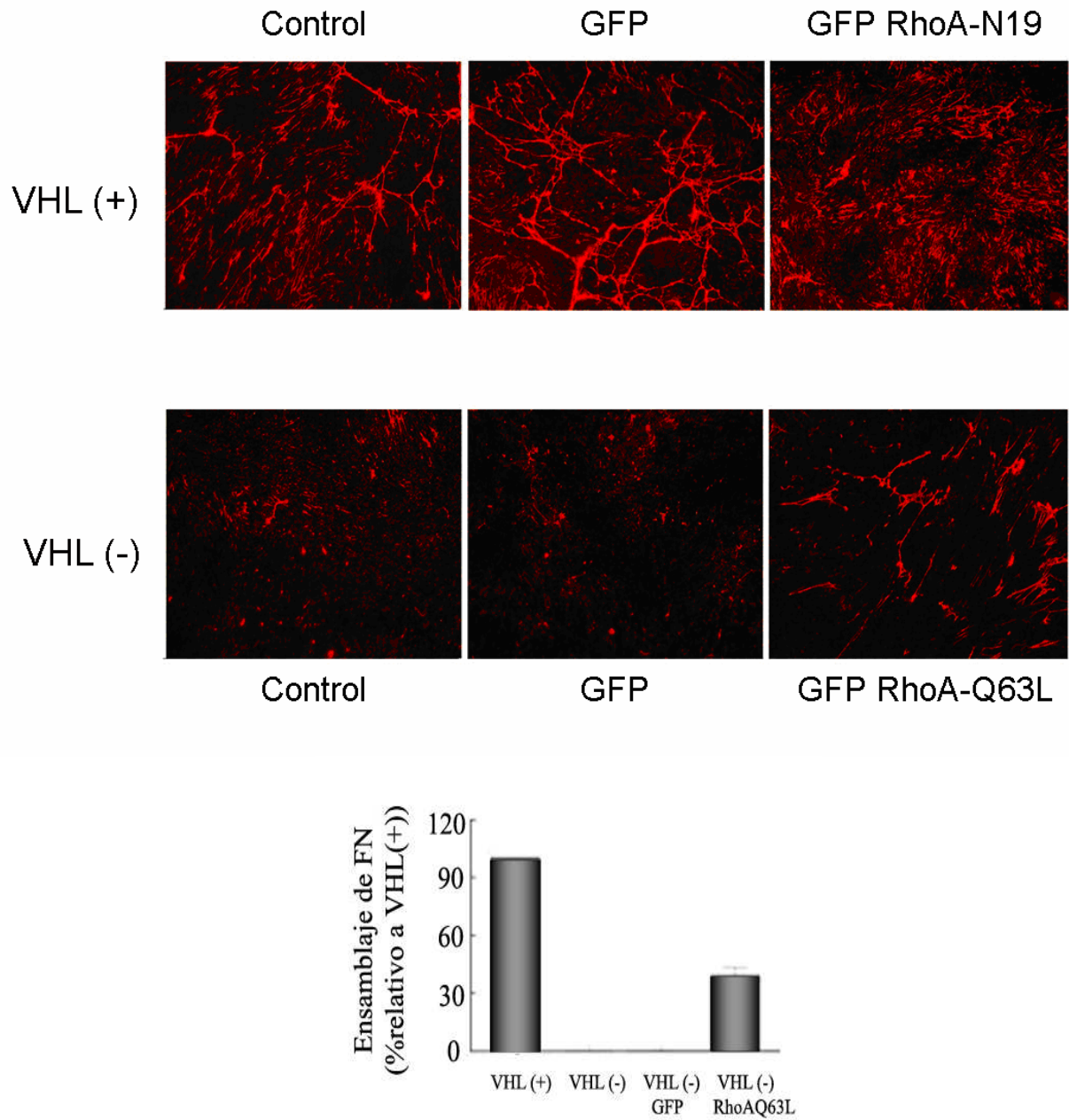
## RESULTADOS

con respecto al ensamblaje observado en células VHL (-) sin infectar o aquellas infectadas con el vector vacío (Fig. 20D, panel inferior).

Estos resultados apoyan la conclusión de que el defecto en el ensamblaje de fibronectina por parte de las células VHL (-) es, en parte, debido a una activación deficiente de la GTPasa RhoA.



D



**Figura 20. Efectos de la expresión del dominante negativo de RhoA y de RhoA constitutivamente activo en células VHL (+) y VHL (-).** (A) Análisis de la eficiencia de infección y niveles de expresión de los mutantes en células 786-O. Las células 786-O VHL (+) se infectaron con un vector retroviral que expresaba GFP como control (GFP) y con el dominante negativo de RhoA (GFP RhoA N19). Las células 786-O VHL (-) se infectaron con GFP y con una forma constitutivamente activa de RhoA (GFP RhoA QL). En el panel superior se muestra un Western blot con la expresión de RhoA tres días después de la infección, y en el panel

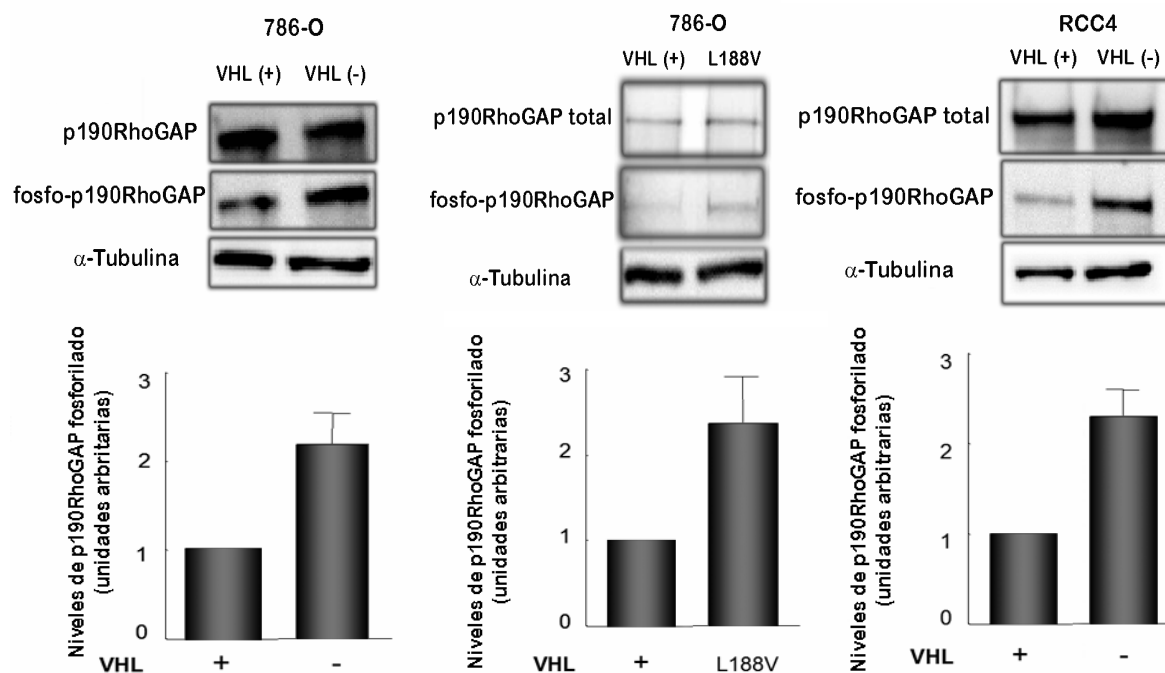
inferior se muestra el análisis de citometría de flujo indicando el porcentaje de células infectadas. (B) Estudio de los cambios morfológicos inducidos tras la infección de las células 786-O con GFP o con GFP RhoA-Q63L en comparación con las células sin infectar (control). Transcurridos siete días de la infección, las células se crecieron hasta alcanzar la confluencia y se estudiaron los cambios morfológicos mediante microscopía de contraste de fases (escala de la barra 50µm). (C) Análisis mediante inmunofluorescencia de la formación de matriz de fibronectina en células VHL (+) sin infectar (control), infectadas con GFP (GFP) o infectadas con GFP RhoA-N19 (panel superior) y células VHL (-) sin infectar o infectadas con GFP o con GFP RhoA QL (panel inferior). Se crecieron las células (2x10<sup>5</sup>) durante 3 ó 4 días a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> y el ensamblaje se analizó tras tinción con un anticuerpo policlonal anti-fibronectina. El diagrama de barras representa la cuantificación del ensamblaje medida en intensidad de fluorescencia  $\pm$  DS analizada mediante Image-J. Se muestran las medias de al menos tres experimentos independientes.

### **2.6 La disminución de la actividad de RhoA en células VHL (-) correlaciona con un aumento en la fosforilación de p190RhoGAP.**

Estudios previos han relacionado la disminución de la actividad de RhoA con la activación de proteínas activadoras de GTP-asas como p190RhoGAP (Arthur, Petch et al. 2000). Por ello, nos preguntamos si en estas células VHL (-) la disminución de la actividad de RhoA podría estar relacionada con la activación de p190RhoGAP. Para ver si esto era así, inmunoprecipitamos p190RhoGAP de los diferentes lisados celulares y analizamos la cantidad de proteína fosforilada con un anticuerpo anti-fosfotirosina (Fig. 21). Los resultados de estos experimentos indicaron que en las células 786-O VHL (-) y en el mutante L188V la fosforilación de p190RhoGAP aumentaba con respecto a las células VHL (+), ( $2.3 \pm 0.3$  y  $2.4 \pm 0.5$  veces respectivamente). Esto mismo se observó en la línea celular RCC4, con un aumento de  $2.35 \pm 0.25$  veces en la fosforilación de p190RhoGAP en las células VHL (-) con respecto a las células VHL (+) (Fig. 21 paneles superior, medio e inferior).

Estos resultados nos indicaban que la disminución de la actividad de RhoA en las células VHL (-) era debida a un aumento en la fosforilación y por tanto de la activación del inhibidor de RhoA p190RhoGAP.





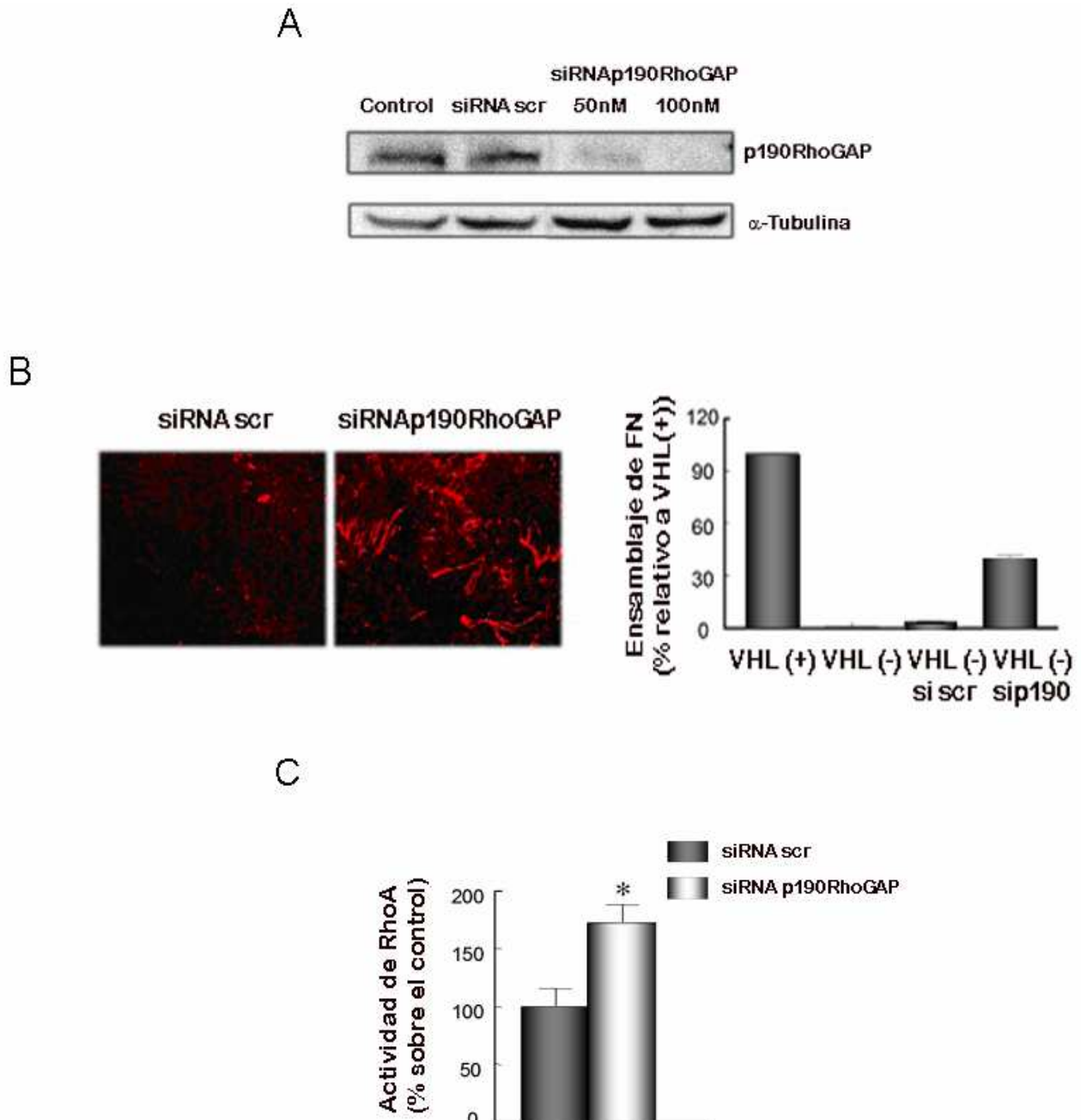
**Figura 21. Estado de fosforilación de p190RhoGAP en las células RCCs VHL (+), VHL (-) y del mutante L188V.** Se crecieron las células 786-O VHL (+) y VHL (-) (panel superior), L188V (panel medio) y RCC4 VHL (+) y VHL (-) (panel inferior) durante 72h en medio completo. Después se pusieron en medio sin suero durante 3h y se lisaron en medio RIPA ( $7 \times 10^6$  células). Los lisados se inmunoprecipitaron con un anti-p190RhoGAP y la cantidad de p190RhoGAP total y de p190RhoGAP fosforilado se analizaron mediante Western blot, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-p190RhoGAP y un anticuerpo anti-fosfotirosina (PY20). Se muestra un experimento representativo de al menos tres experimentos realizados. La gráfica representa la cantidad de fosfo-p190RhoGAP normalizada frente al total.

## 2.7 El silenciamiento de p190RhoGAP en células VHL (-) reestablece parcialmente su capacidad para ensamblar fibronectina.

Anteriormente hemos visto que en las células VHL (-) el aumento de la fosforilación de p190RhoGAP se correlaciona con la pérdida de actividad de RhoA. Por tanto, el siguiente paso era determinar cuál era el papel de p190RhoGAP en el ensamblaje de fibronectina. Para ello realizamos experimentos de interferencia de p190RhoGAP en células VHL (-) y se analizó la capacidad de estas células para formar fibras de fibronectina. La interferencia de p190RhoGAP en células VHL (-) alcanzada en nuestros experimentos fue de alrededor de un 85-95% en la expresión de la proteína p190RhoGAP (Fig. 22A). El análisis de ensamblaje de fibronectina en estas células mostró la presencia

## RESULTADOS

de haces de fibras de fibronectina en un 39% de las células interferidas con respecto a las células VHL (+) (Fig. 22B), muy similar al ensamblaje de fibronectina que se obtenía al infectar las células VHL (-) con RhoA GFP RhoAQ63L. También quisimos saber si tras la interferencia de p190RhoGAP se afectaba la actividad de RhoA. El análisis de actividad de RhoA en las células interferidas con un siRNA para p190RhoGAP mostró un aumento de  $1.7 \pm 0.15$  veces en la actividad de RhoA con respecto al control transfectado con una secuencia inespecífica escogida al azar (Fig. 22C).



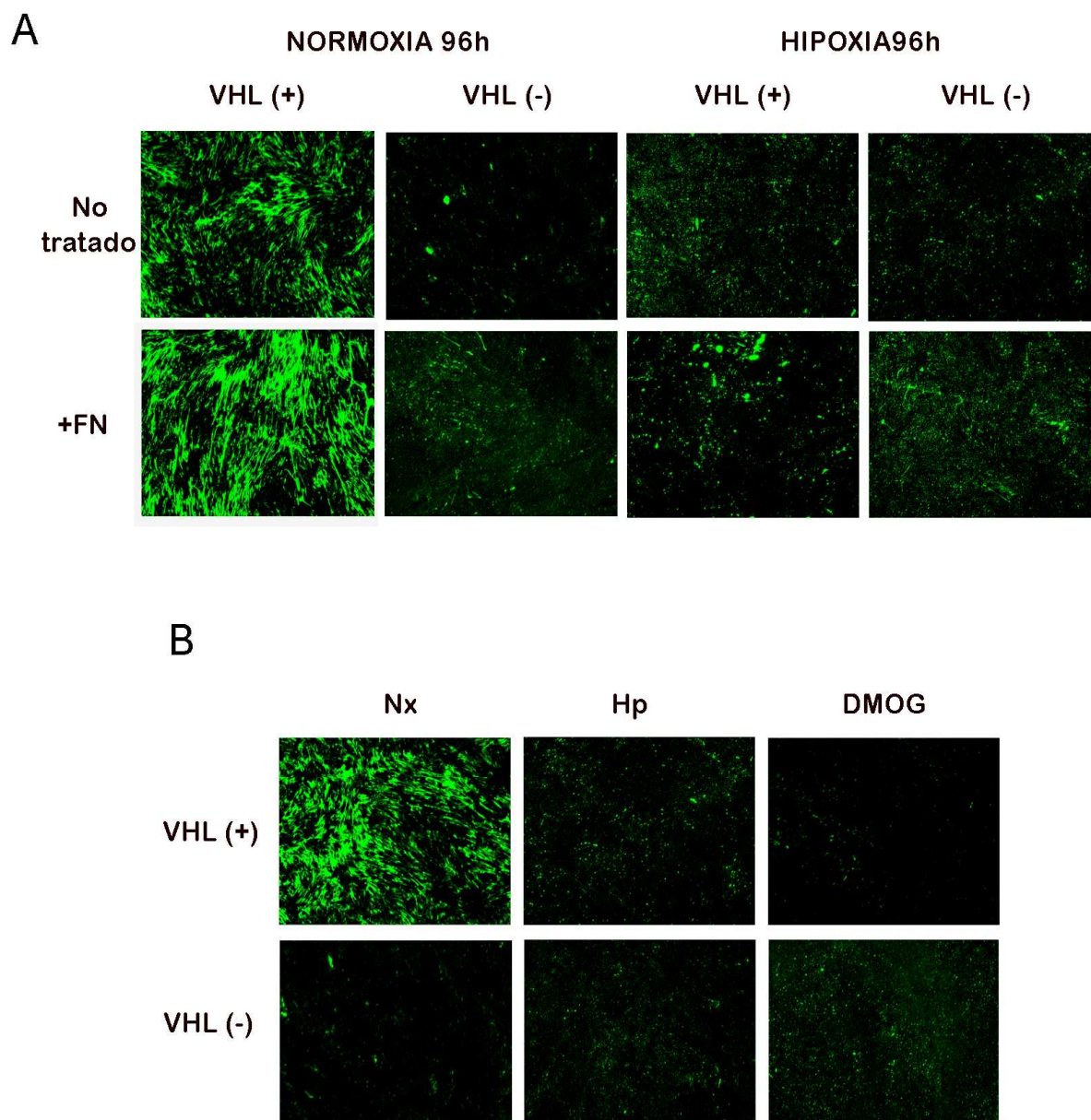


**Figura 22. Efecto de la interferencia de p190RhoGAP en el ensamblaje de fibronectina de las células VHL (-).** (A) Análisis mediante Western blot de los niveles de p190RhoGAP en células 786-O VHL (-) sin interferir (control) o interferidas con un siRNA inespecífico (siRNA scr) o con un siRNA específico para p190RhoGAP. (B) Análisis mediante inmunofluorescencia de la formación de matriz de fibronectina producida por las células 786-O VHL (-) interferidas con siRNA scr o siRNA frente a p190RhoGAP (100nM) comparadas con el control sin interferir. Se representa el porcentaje de ensamblaje en un experimento representativo relativizado al ensamblaje formado por las células VHL (+). (C) Cuantificación de la actividad de RhoA mediante el kit de RhoGELISA de Cytoskeleton en las células VHL (-) transfectadas con siRNA scr o con el siRNA frente a p190RhoGAP. Se representa la media  $\pm$  DS de tres experimentos realizados.

## 2.8 La hipoxia afecta la formación de matriz de fibronectina en células VHL (+).

Hemos visto que en el defecto de ensamblaje de FN de las células VHL negativas está implicada la ruta de señalización de RhoA. Sin embargo, no parece ser el único mecanismo puesto que el ensamblaje de FN solo se recupera parcialmente al introducir un mutante constitutivamente activo de RhoA en células VHL negativas. Parecía que la sobreexpresión de HIF2 $\alpha$  no afectaba al ensamblaje de FN y quisimos saber que pasaba si sometíamos las células a condiciones de hipoxia. Realizamos experimentos de inmunofluorescencia tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia con células VHL (+) y VHL (-) y observamos que las células VHL (+) no ensamblaban FN cuando las metíamos en hipoxia (Fig. 23A). Además, para descartar que hubiera un problema de secreción de FN o en hipoxia se produjera una FN anómala, añadimos FN exógena (Fig. 23B).

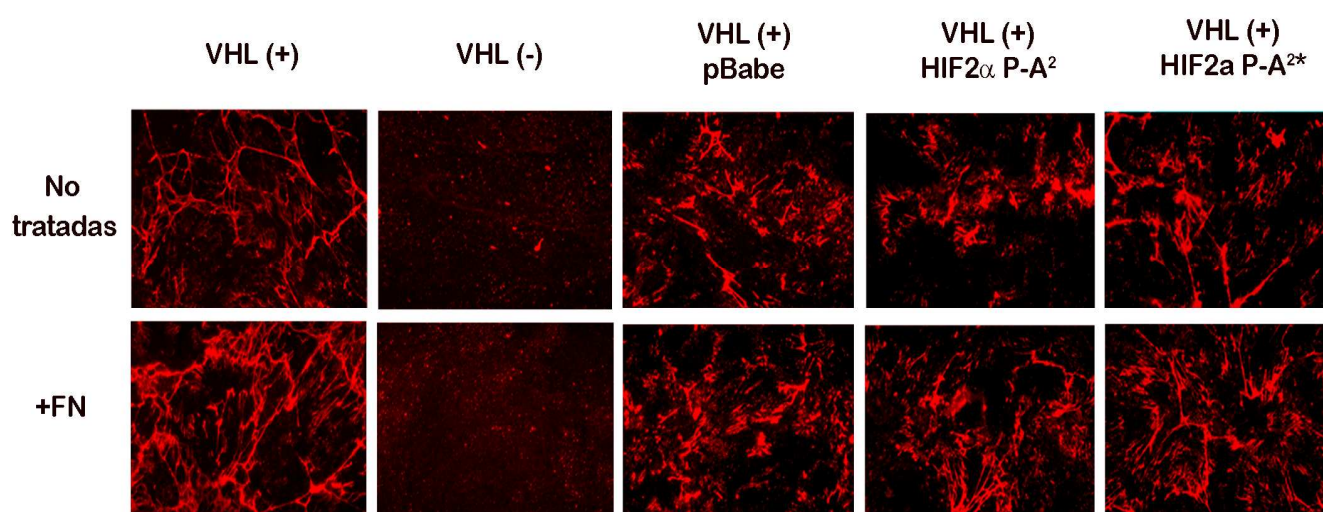
Además quisimos probar qué pasaba con inhibidores químicos de las PHDs (también llamados miméticos de hipoxia) y vimos que ocurría lo mismo que en hipoxia, también se perdía el ensamblaje de FN (Fig. 23). Para descartar que hubiera algún problema de síntesis de FN durante la hipoxia, añadimos FN a los cristales de inmunofluorescencia y el resultado que obtuvimos fue de nuevo la pérdida del ensamblaje (Fig. 23).



**Figura 23. Ensamblaje de FN producido por células 786-O VHL (+) y VHL (-) en condiciones de hipoxia y con miméticos de hipoxia.** (A) Las células 786-O VHL (+) y VHL (-) se crecieron en condiciones de normoxia (21%O<sub>2</sub>), en hipoxia (1%O<sub>2</sub>) y añadiendo un mimético de hipoxia, DMOG (1mM), durante tres días. Al cabo de ese tiempo, analizamos la formación de matriz de FN mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo policlonal anti-FN. Se muestra un experimento representativo de muchos realizados. (B) Se añadió FN exógena y se repitieron los experimentos de inmunofluorescencia en normoxia e hipoxia en las mismas condiciones que en el apartado A.

## 2.9 La pérdida de ensamblaje de FN en las células VHL (-) es independiente de HIF2 $\alpha$ .

Una de las funciones mejor descritas de VHL es regular la degradación de HIF $\alpha$  (Maxwell, Wiesener et al. 1999). Dado que este factor de transcripción es un factor clave en la respuesta celular a hipoxia, pensamos que sería interesante estudiar la implicación del mismo en la pérdida de ensamblaje de FN. Para ello infectamos células VHL (+) con un vector retroviral vacío (pBabe), con una construcción de HIF $\alpha$  resistente a degradación mediada por VHL (HIF2 $\alpha$  P-A<sup>2</sup>), o con una construcción de HIF resistente a degradación pero con una mutación en el dominio de unión a ADN y por tanto transcripcionalmente inactivo (HIF2 $\alpha$  P-A<sup>2\*</sup>). Tras comprobar que las infecciones habían sido eficientes, se analizó la formación de la matriz de FN por estas células en presencia o ausencia de fibronectina exógena (Fig. 24). Los resultados indicaron que tanto las células infectadas con HIF2 $\alpha$  P-A<sup>2</sup> como las infectadas con HIF2 $\alpha$  P-A<sup>2\*</sup> producían un ensamblaje similar al de las células control pBabe y al de las células VHL (+) sin infectar. Esto indicaba que aunque la hipoxia afecte al ensamblaje de FN en células 786-O VHL (+), la pérdida del mismo en era independiente de la expresión de HIF2 $\alpha$ . Por tanto, aunque las células VHL (-), cuya expresión de HIF2 $\alpha$  es constitutiva, no podemos atribuir el defecto en el ensamblaje a este factor, y por ello, es posible que otros mecanismos aparte de los ya estudiados en este trabajo, estén regulando el ensamblaje de FN en ausencia de VHL.

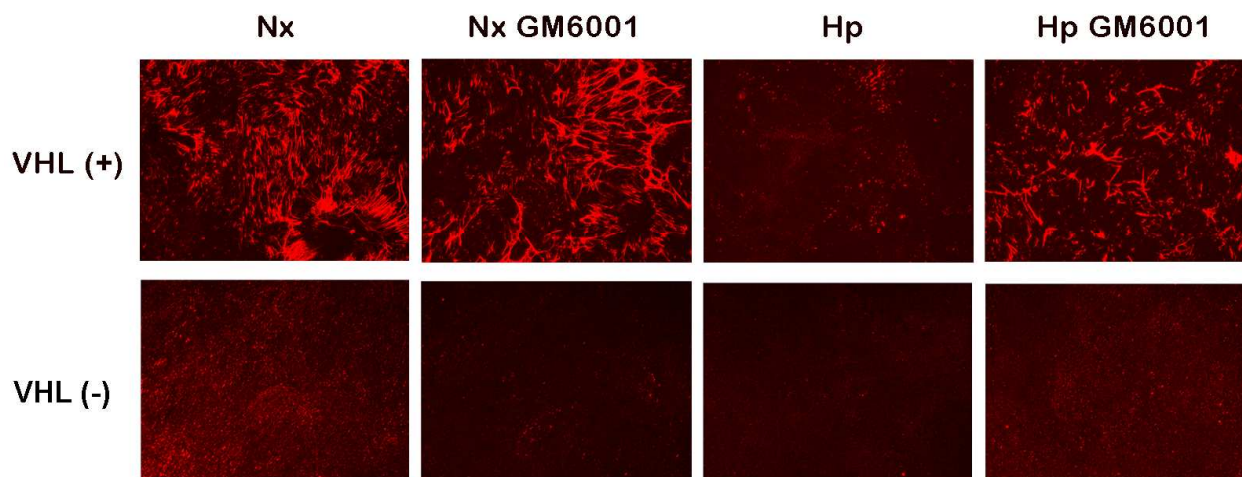


**Figura 24. Ensamblaje de FN en células 786-O VHL (+) infectadas con HIF2 $\alpha$  resistente a degradación.** Las células 786-O se infectaron con un vector retroviral vacío ( pBabe), con una construcción de HIF2 $\alpha$  resistente a degradación (HIF2 $\alpha$  P-A<sup>2</sup>), o con un mutante transcripcionalmente inactivo (HIF2 $\alpha$  P-A<sup>2\*</sup>). Las células se mantuvieron en cultivo durante 3 días tras los que se analizó el ensamblaje de fibronectina mediante microscopía de fluorescencia en ausencia o presencia de fibronectina exógena. Se muestra un experimento representativo de al menos tres realizados.

### 2.10 Inhibidores de las metaloproteinasas revierten la pérdida de ensamblaje de FN en las células VHL (+) en condiciones de hipoxia.

La implicación de las metaloproteasas (MMPs) en la degradación de matriz extracelular ha sido descrita en numerosos trabajos siendo este un mecanismo implicado en la migración de las células tumorales para producir metástasis (Matias-Roman, Galvez et al. 2005; Petrella and Brinckerhoff 2006). Por otro lado también se ha descrito que la expresión de estas enzimas se induce en hipoxia de forma dependiente de HIF (Petrella, Lohi et al. 2005). Teniendo esto en cuenta, y considerando la ausencia de ensamblaje de FN que demuestran nuestros experimentos en hipoxia, cabe la posibilidad de que en estas condiciones la ausencia de matriz de FN sea debida a una degradación de la misma mediada por metaloproteasas. Por ello quisimos comprobar en qué modo estas MMPs estaban jugando algún papel en este proceso. Con este fin realizamos experimentos de inmunofluorescencia con células VHL (+) y VHL (-) en presencia de un inhibidor de las MMPs, GM6001. Como resultado, se observó que en presencia de dicho inhibidor tanto en normoxia como en hipoxia se recuperaba parcialmente el ensamblaje de matriz de FN en células VHL (+) pero, sin embargo, no observamos ningún efecto en las células VHL (-) (Fig. 25).



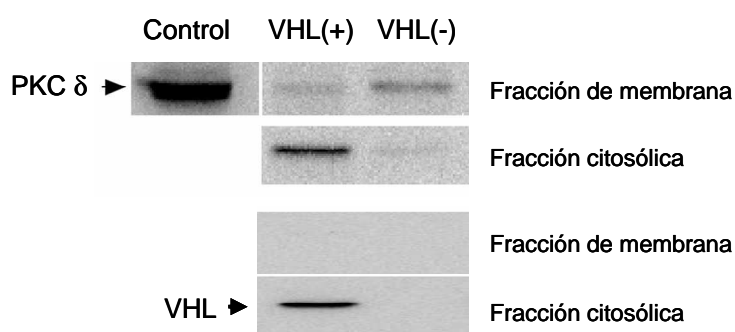


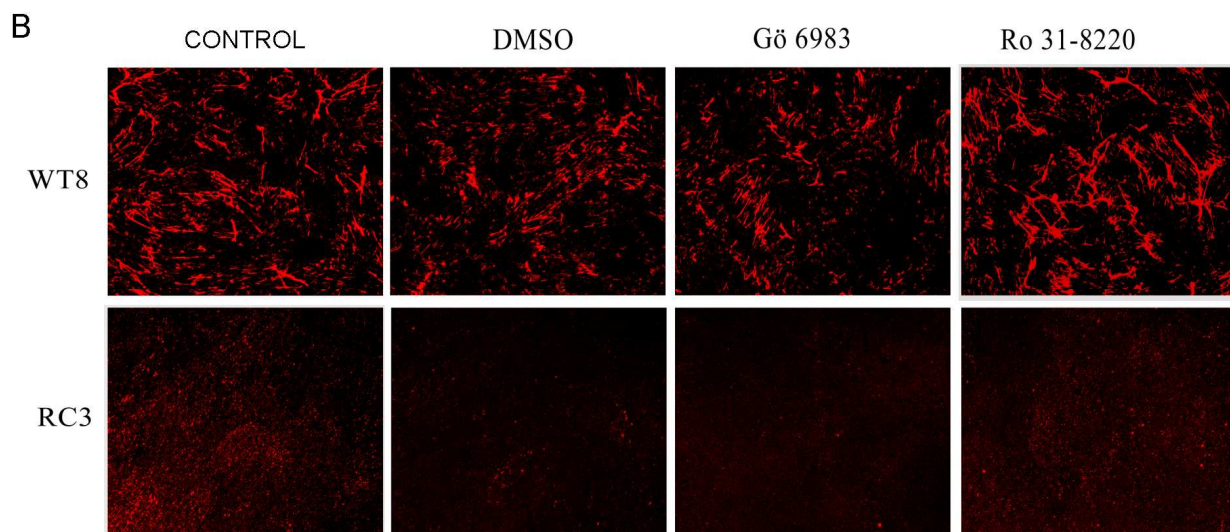
**Figura 25. Efecto de un inhibidor de MMPs en el ensamblaje de FN en las células 786-O.** Las células 786-O se cultivaron durante tres días en presencia o ausencia de GM6001 (25 $\mu$ M) y en condiciones de normoxia (21%O<sub>2</sub>) y de hipoxia (1%O<sub>2</sub>). Se analizó la matriz de FN formada mediante microscopía de fluorescencia. Se muestra un experimento representativo de, al menos, tres realizados.

## 2.11 Inhibidores de las PKCs no tienen efecto en el de ensamblaje de FN en las células 786-O.

Para profundizar en el estudio de la pérdida de ensamblaje de FN en células VHL (-) quisimos estudiar el estado de activación de la PKC delta en célula VHL (+) y células VHL (-) y su implicación en la formación del ensamblaje, puesto que se ha descrito que las PKCs atípicas están implicadas en la regulación de la actividad de RhoA (Mehta, Rahman et al. 2001; Holinstat, Mehta et al. 2003; Pang and Bitar 2005) y que PKC delta interacciona con p190RhoGAP en células endoteliales (Harrington, Shannon et al. 2005).

A





**Figura 26: Efecto de las PKCs en el ensamblaje de FN.** (A) Análisis mediante WB de la localización de PKC delta en células VHL (+) y VHL (-). Las células se crecieron hasta confluencia y se lisaron con un protocolo de fraccionamiento de membrana y citoplasma. (B) ) Análisis mediante inmunofluorescencia de la formación de matriz de fibronectina producida por las células 786-O VHL (+) y VHL (-) tratadas con los inhibidores de las PKCs Gö6983 (60nM) y Ro 31-8220 (8μM).

## *DISCUSIÓN*





VHL es un gen supresor de tumores cuya expresión regula el mantenimiento del epitelio renal (Kaelin 2002). Su papel como regulador de la estabilidad de HIF es una de las funciones mejor descritas (Maxwell, Wiesener et al. 1999; Cockman, Masson et al. 2000; Tanimoto, Makino et al. 2000; Barry and Krek 2004) y el mecanismo de esta regulación constituye la ruta canónica mejor aceptada. Sin embargo hay otras funciones atribuidas a esta proteína para las cuales se desconocen los mecanismos fundamentales implicados. Dos ejemplos claros son el papel de VHL en la organización de la matriz extracelular de fibronectina y la conservación de un fenotipo diferenciado (Ohh, Yauch et al. 1998; Davidowitz, Schoenfeld et al. 2001; Esteban-Barragan, Avila et al. 2002; Lewis and Roberts 2003). Con respecto al último, varios grupos han mostrado que la reexpresión de VHL induce una organización epitelial en monocapa en líneas RCC VHL (-), cuya morfología característica es fibroblástica (Davidowitz, Schoenfeld et al. 2001; Esteban-Barragan, Avila et al. 2002; Lewis and Roberts 2003). Además, las células RCC transfectadas con VHL desarrollan estructuras comprimidas y densas, mientras que las células VHL (-) presentan conexiones débiles (Lieubeau-Teillet, Rak et al. 1998). Dado el papel esencial de las uniones intercelulares en la regulación de la citoarquitectura epitelial (Tsukita, Furuse et al. 2001; Conacci-Sorrell, Zhurinsky et al. 2002; Thiery 2002; Matter and Balda 2003; Mullin 2004), una posible explicación de estas alteraciones sería que la presencia de VHL en diferentes líneas celulares de RCC es necesaria para la formación de uniones intercelulares. En este trabajo demostramos que la ausencia de VHL en estas líneas produce una desestructuración de las uniones intercelulares tanto adherentes como ocluyentes, presentando además alteraciones en la polaridad de la célula, y por el contrario la reexpresión de VHL revierte estas modificaciones fenotípicas. Los experimentos para analizar la integridad de estas uniones se centraron básicamente en el patrón de distribución de dos proteínas esenciales para la formación de uniones adherentes y ocluyentes, como son la  $\beta$ -catenina y ZO-1. Nuestros resultados han demostrado que la formación deficiente de dichas uniones adherentes y ocluyentes no era debida a cambios en la expresión de alguno de estos componentes, sino a su interacción deficiente con el citoesqueleto de actina y a defectos en los mecanismos de señalización de estos procesos.

Dado el papel de VHL en la regulación de HIF $\alpha$ , determinar si los efectos de la pérdida de VHL en la formación de uniones intercelulares y en la citoarquitectura epitelial

están directa o indirectamente relacionados con HIF es un paso importante para poder entender las consecuencias de su inactivación. Varios estudios han mostrado que la hipoxia es capaz de promover cambios en la morfología celular en varios tipos celulares, aunque todavía no se ha descrito una conexión clara entre HIF y la inducción de un fenotipo diferenciado (Jogi, Ora et al. 2002; Helczynska, Kronblad et al. 2003). Nuestros experimentos muestran que células RCC 786-O transfectadas de forma estable con formas de VHL mutadas que mantienen su capacidad de regular HIF $\alpha$  de forma normal, no mejoran ni sus características epiteliales ni las uniones intercelulares. Además, la sobreexpresión en células 786-O VHL (+) de una forma mutada de HIF 2 $\alpha$  que la hace resistente a degradación no alteró la morfología epitelial de estas células. Estos resultados por tanto demuestran la existencia de funciones mediadas por VHL independientes de HIF. En relación a esto, un estudio reciente en *Caenorhabditis elegans* muestra que ciertos genes implicados en el control de interacciones célula-matriz están regulados por VHL de forma independiente de HIF (Bishop, Lau et al. 2004), confirmando por tanto nuestros resultados.

Estudios previos indican que la activación de HIF2 $\alpha$  juega un papel esencial en la tumorigénesis de las líneas celulares RCC VHL (-) (Kondo, Klco et al. 2002; Kondo, Kim et al. 2003; Zimmer, Doucette et al. 2004). En contraposición a estos resultados, dos trabajos recientes muestran que ciertas formas mutantes de VHL (entre ellas las utilizadas en este trabajo, las RRR) retienen la capacidad de regular HIF de forma normal pero no previenen la tumorigénesis de RCC (Stickle, Chung et al. 2004; Lolkema, Gervais et al. 2005). En esta misma línea otros autores han demostrado que la expresión de una forma mutada de HIF1 $\alpha$  resistente a su degradación y expresada en las líneas celulares RCC no es suficiente para promover tumorigénesis (Maranchie, Vasselli et al. 2002). Nuestros resultados y los resultados publicados por Bishop T. y colaboradores (Bishop, Lau et al. 2004) indican la existencia de funciones de VHL independientes de HIF, y por tanto pueden ayudar a entender cómo VHL regula la tumorigénesis de células RCC por mecanismos que no impliquen la estabilización de HIF. Dada la complejidad de estos resultados, es probable que la suma de ambos efectos, tanto los HIF-dependientes como los HIF-independientes, sean importantes para la progresión de RCC, por tanto suprimiendo cualquiera de las dos vías reduce la tumorigénesis de las líneas celulares RCC VHL negativas. En este trabajo nosotros sugerimos que la incapacidad para formar las uniones

intercelulares apropiadas quizás sea otra manera por la que la inactivación de VHL promueve el crecimiento tumoral de forma independiente de HIF. Por tanto, la pregunta que nos planteamos era si HIF no está implicado en este proceso, ¿Cómo regula VHL la formación de uniones intercelulares y la polaridad celular? Se sabe que las células VHL negativas carecen de la formación de fibras de fibronectina (Ohh, Yauch et al. 1998). Dado que la citoarquitectura epitelial está regulada por la matriz de fibronectina (Robinson, Foty et al. 2004), nos preguntamos si la falta de una matriz de fibronectina podría subyacer a la interrupción de uniones intercelulares en células RCC VHL negativas. Sin embargo, el bloqueo de la formación de matriz de fibronectina en células RCC transfectadas con VHL salvaje no alteró su fenotipo epitelial, indicando por tanto que la rotura de fibras de fibronectina no es responsable de la ausencia de uniones intercelulares adecuadas en las células VHL negativas. Otra posibilidad sería que VHL controlase la expresión de componentes claves para la formación de uniones intercelulares, como serían proteínas transmembrana, proteínas del citoesqueleto, o bien moléculas señalizadoras de dichas proteínas. Curiosamente, ni las células 786-O VHL (-) ni VHL (+) expresan E-cadherina, una molécula transmembrana esencial para la formación de uniones adherentes (Davidowitz, Schoenfeld et al. 2001), indicando que por lo menos en este caso se necesitan otras explicaciones. En este mismo sentido un trabajo reciente realizado por Harten S.K. y colaboradores demuestra que la regulación de uniones ocluyentes por VHL en células RCCs implica mecanismos independientes de la expresión de E-cadherina en esas células (Harten, Shukla et al. 2009) Además, dado que la distribución subcelular y la función de moléculas implicadas en las uniones intercelulares pueden estar reguladas por cambios más sutiles, tales como la fosforilación de residuos específicos (Conacci-Sorrell, Zhurinsky et al. 2002), es posible que VHL controle la formación de estas uniones mediante este tipo de mecanismos. Aparte de las posibilidades mencionadas anteriormente, otros estudios proponen la existencia de una conexión entre VHL y otras funciones adicionales de la célula que podrían explicar la polaridad alterada de la célula así como la formación anómala de uniones intercelulares en las RCC deficientes para la expresión de VHL (Barry and Krek 2004). Estas funciones de VHL han sido descritas por otros autores, siendo estas la regulación de la estabilidad de microtúbulos (Hergovich, Lisztwan et al. 2003; Lolkema, Mehra et al. 2004)

Otros autores además demuestran que VHL colocaliza con la red de microtúbulos promoviendo la estabilidad de los mismos, de manera que la interrupción del citoesqueleto de microtúbulos altera la polaridad de la célula en múltiples modelos celulares (Ahringer 2003; Grevengoed and Peifer 2003). Para clarificar si esta disminución en la estabilidad de microtúbulos es responsable de las modificaciones del citoesqueleto de las células RCC VHL negativas, sería importante entender en primer lugar cómo VHL se une a los microtúbulos y los regula. Una posibilidad sería mediante la regulación de las PKCs ya que se ha descrito que VHL se une a las isoformas  $\epsilon$  y  $\nu$  de PKCs (Okuda, Hirai et al. 1999). Además, en el caso de la isoforma atípica lambda de PKC, VHL regula la ubiquitinación de la forma activada de la proteína, llevándola a su eliminación y así limitando su actividad celular (Okuda, Saitoh et al. 2001). Las PKCs atípicas controlan la polaridad de la célula y las uniones intercelulares, por lo menos en parte regulando la actividad de la familia de proteínas Rho-GTPasas (Etienne-Manneville and Hall 2002; Fukata, Nakagawa et al. 2003). Un primer enfoque sería estudiar si las mutaciones de VHL (las que no puede sufrir nedilación y las de tipo 2C) se asocian con modificaciones en uniones intercelulares y con desregulación de la actividad de PKC atípicas.

Otra función de VHL que también parece ser independiente de HIF es la formación de matriz de fibronectina extracelular (Bluyssen, Lolkema et al. 2004). En las células RCC VHL negativas la pérdida del ensamblaje de FN se relaciona con un aumento de la angiogénesis mediante infiltración de vasos sanguíneos en el tumor (Kurban, Hudon et al. 2006). Por tanto, la función de pVHL en la regulación del ensamblaje de FN parece ser muy importante para su función como supresor de tumores (Kurban, Hudon et al. 2006). Por este motivo nosotros nos planteamos estudiar por qué las células RCC VHL negativas no son capaces de formar una matriz de FN adecuada. En este fallo de ensamblaje podría estar implicado un defecto en la expresión y/o función de las integrinas o un fallo en la síntesis de FN. En este sentido, trabajos previos del laboratorio habían demostrado que la expresión y función de las integrinas no era significativamente diferente en células RCC VHL positivas y células RCC VHL negativas (Esteban-Barragan, Avila et al. 2002). Además, en este trabajo demostramos que la producción de FN no se correlaciona con la falta de ensamblaje de la misma. Con respecto a esto, algunas células de los tumores RCC acumulan FN en el citoplasma y tienen muy poca cantidad de FN, o incluso nada, en el estroma (He, Liu et al. 2004), cosa que podría sugerir que la FN no se

transporte de forma adecuada y no se secrete, lo que podría contribuir a la pérdida de ensamblaje en estas células. Sin embargo, resultados previos usando células en cultivo, no parecen evidenciar este acúmulo de FN (Esteban-Barragan, Avila et al. 2002). Además, recientemente se ha demostrado que estas células VHL negativas siguen manteniendo la capacidad de secretar FN (Kurban, Hudon et al. 2006). Esto apoya nuestros resultados en los que los niveles de FN producida por las células VHL negativas son independientes de la capacidad de estas células de ensamblarla.

Existen otras posibilidades en cuanto a la regulación de FN por pVHL. En primer lugar, se propuso que pVHL podría interaccionar con FN y ésta se modificase de alguna manera que la hiciera capaz de ensamblarse (Clifford, Cockman et al. 2001; Hoffman, Ohh et al. 2001; Bindra, Vasselli et al. 2002). En este sentido también se ha descrito que pVHL interacciona de forma directa con colágeno IV (Grosfeld, Stolze et al. 2007; Kurban, Duplan et al. 2007), lo que podría indicar que pVHL juega un papel importante en la modulación de los componentes de la matriz extracelular, por tanto no sería algo exclusivo de la FN, puesto que se ha demostrado que la interacción entre pVHL y colágeno parece ser necesaria para el ensamblaje de éste en fibras. A pesar de esto, no está claro como pVHL podría mediar este proceso ya que estos mismos autores demuestran que esta función de pVHL es independiente de su actividad ubiquitin-ligasa. Puesto que pVHL tiene la capacidad de macar a las proteínas para su degradación vía proteosoma, VHL podría estar implicada en eliminar las moléculas de FN mal procesadas, regulando la FN de forma post-traducciona. Aunque esta posibilidad sigue existiendo, Kurban et al demuestran que la interacción entre pVHL y FN es indirecta y que podría estar incluso mediada por colágeno IV. A pesar de que esta interacción, bien sea directa o indirecta, parece ser importante, podría no ser suficiente para llevar a cabo el ensamblaje de FN.

Una segunda posibilidad podría ser que pVHL regulara el ensamblaje de FN regulando a otras proteínas implicadas en la degradación de la matriz extracelular. Con respecto a esto, se ha propuesto que la FN extracelular de las células VHL negativas se está degradando por la acción de metaloproteasas como por ejemplo la MMP-2 (Kurban, Hudon et al. 2006). Esto estaría de acuerdo con el hecho de que la expresión de MMPs está aumentada en células que pierden la función de VHL (Koochekpour, Jeffers et al. 1999; Jiang, Zhang et al. 2003). Además nuestros experimentos demuestran que células VHL

positivas que pierden el ensamblaje de la matriz extracelular de FN, lo recuperan parcialmente al ser tratadas con inhibidores de las MMPs. Por el contrario, las células VHL negativas no son capaces de recuperar el ensamblaje de FN, lo que indica que varios mecanismos están implicados en la formación de ensamblaje. Podríamos sugerir que se necesita un defecto funcional adicional asociado a la pérdida de VHL, que no sea la modificación de la FN, lo que podría estar tomando parte en este proceso considerando nuestros resultados en los que las células VHL negativas no son capaces de ensamblar una matriz de FN, ni incluso añadiéndoles FN exógena. Además, en este trabajo, analizamos la posibilidad de que procesos intracelulares como la reorganización del citoesqueleto y la contractibilidad celular, podrían estar regulando el ensamblaje de FN en las células VHL negativas. Con respecto a esto, las células VHL negativas no forman estructuras apropiadas relacionadas con la organización del citoesqueleto y la contractibilidad celular (Kamada, Suzuki et al. 2001; Esteban-Barragan, Avila et al. 2002; Calzada, Esteban et al. 2006). Esto lo apoya el hecho de que células VHL negativas plaqueadas sobre FN exógena no sean capaces de iniciar el proceso de ensamblaje de FN. Esto puede ser debido parcialmente a que en estas células haya una activación deficiente de la GTPasa pequeña RhoA, puesto que RhoA es un regulador importante de la organización del citoesqueleto (Ridley 2001). La alteración de la actividad de esta GTPasa en las células VHL negativas puede estar implicada en el fenotipo fibroblástico de estas células. La pérdida de la formación adecuada de las uniones intercelulares en estas células también es responsable de este fenotipo fibroblástico (Calzada, Esteban et al. 2006), y también podría estar implicado en la pérdida del ensamblaje de la FN. Con respecto a esto, mostramos claramente que las células VHL negativas tienen la actividad de RhoA disminuida, probablemente debido a un aumento en la actividad de un inhibidor de RhoA, p190RhoGAP. Esto está apoyado por otros resultados en los que en las células VHL negativas se reestablece parcialmente la capacidad de ensamblar una matriz de FN silenciando el gen de p190RhoGAP.

Hasta el momento no se ha establecido una relación entre VHL y las GTPasas pequeñas de la familia de Rho y se desconoce como VHL es capaz de regular este proceso. Una posibilidad sería que pVHL regulara indirectamente RhoA interaccionando con una segunda proteína. Por ejemplo pVHL puede interaccionar con las PKC atípicas (Pal, Claffey et al. 1997; Iturrioz, Durgan et al. 2006) y modificar su actividad (Kamada, Suzuki et al. 2001). Además, las PKCs atípicas están implicadas en la regulación de la actividad de

RhoA (Mehta, Rahman et al. 2001; Holinstat, Mehta et al. 2003; Pang and Bitar 2005). Además está demostrado que PKC delta interacciona con p190RhoGAP en células endoteliales (Harrington, Shannon et al. 2005). Existe, por tanto, la posibilidad de que pVHL interaccione con las PKCs atípicas, module el estado de fosforilación de los inhibidores de RhoA (GDI, p190RhoGAP) y/o de los activadores de RhoA (GEF) regulando así la actividad de las Rho GTPasas. Esta hipótesis estaría de acuerdo con nuestros resultados en los que vemos que en células VHL negativas hay un aumento en la fosforilación de p190RhoGAP. Además, esto está en concordancia con el hecho de que observamos un aumento de PKC delta en membrana (y por tanto activa) en células VHL negativas que podría estar regulando la fosforilación de p190RhoGAP. Por el contrario, al analizar el ensamblaje de FN añadiendo inhibidores de la activación de PKC $\delta$ , no observamos ningún efecto.

Una cuestión que quedaría por contestar sería cómo en las células VHL negativas la disminución de la actividad de RhoA podría contribuir a los cambios fenotípicos observados y a la tumorigénesis de estas células. Se sabe que las Rho GTPasas están implicadas en patologías de enfermedades en ovario incluido el cáncer (Li and Lim 2003). Además, impidiendo la activación de RhoA vía p190RhoGAP, las células de melanoma son capaces de migrar (Moyano, Maqueda et al. 2003). Por esto sería razonable pensar que una disminución en la actividad de las Rho GTPasas puede estar implicada en la patogénesis del carcinoma renal.

En resumen este trabajo demuestra que la formación de uniones intercelulares y el ensamblaje de FN están afectados en las células VHL negativas y que está alterada una ruta de señalización implicada en la contractibilidad celular, lo que contribuye a la incapacidad de estas células de formar unas uniones intercelulares adecuadas y de ensamblar una matriz de FN. Además, los resultados con los mutantes de VHL 2C indica que este mecanismo es independiente de HIF y nosotros presentamos un mecanismo alternativo que explicaría el defecto en el ensamblaje de la matriz extracelular observado en estas células. Aunque el papel de pVHL en este mecanismo y si esto es general de otras líneas celulares queda todavía por concretar.

En conclusión, nuestros descubrimientos en este campo pueden ayudar a entender cómo actúa VHL como un gen supresor de tumores en el riñón y además son un paso adelante que ayuda a confirmar la existencia de funciones reguladas por VHL por mecanismos independientes de HIF $\alpha$ .

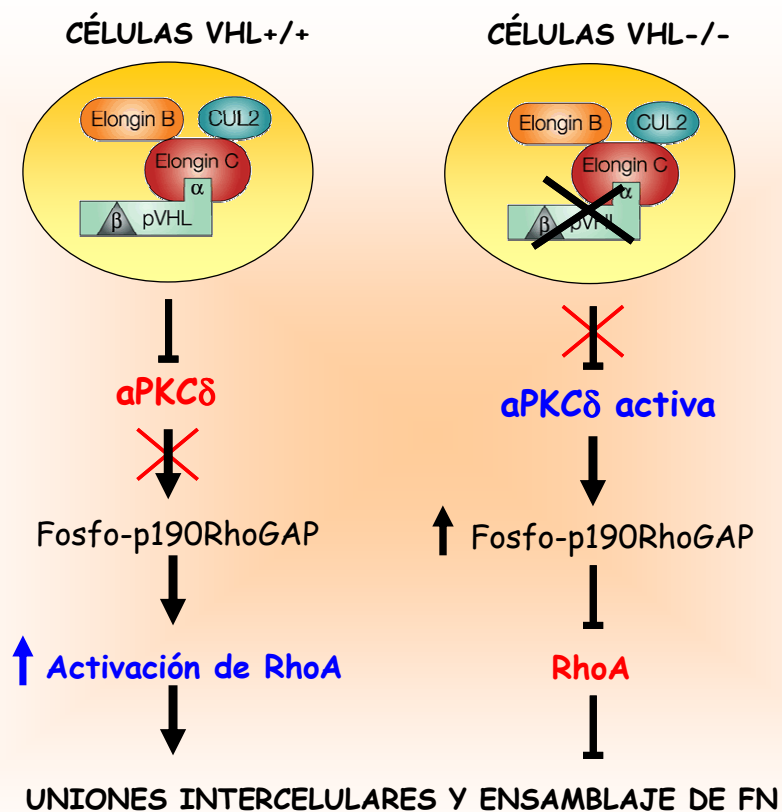


Figura 27. Hipótesis de la regulación de la formación de uniones intercelulares y matriz de FN por VHL.



## ***CONCLUSIONES***



- 1. La pérdida de VHL conlleva un defecto en la formación de uniones intercelulares adherentes y ocluyentes, viéndose afectada la citoarquitectura celular y la permeabilidad de la monocapa de células.**
- 2. El fallo en la formación de uniones intercelulares adherentes y ocluyentes en células VHL negativas es independiente de HIF $\alpha$ .**
- 3. El bloqueo de la formación de una matriz de FN no afecta a la correcta formación de uniones intercelulares adherentes y ocluyentes.**
- 4. Las células VHL negativas no son capaces de ensamblar una matriz de FN adecuada. Este defecto no se debe a diferencias en la secreción de FN ni a cambios en la funcionalidad de la misma.**
- 5. El defecto de ensamblaje de matriz de FN en las células de carcinoma renal VHL negativas es independiente de HIF $\alpha$ .**
- 6. El fallo del ensamblaje de FN en estas células VHL negativas está en el mecanismo de tracción de las moléculas de FN para ser ensambladas, habiendo un defecto en la activación de la GTPasa RhoA, proteína encargada de realizar este proceso.**
- 7. La menor activación de RhoA en células VHL negativas se debe a un aumento de la actividad de un inhibidor de ésta, la proteína p190RhoGAP.**
- 8. Las células de carcinoma renal transfectadas establemente con VHL pierden la capacidad de ensamblar FN en condiciones de hipoxia y esto se revierte parcialmente añadiendo inhibidores de MMPs.**



## ***BIBLIOGRAFÍA***



- Ahringer, J. (2003). "Control of cell polarity and mitotic spindle positioning in animal cells." Curr Opin Cell Biol **15**(1): 73-81.
- Ang, S. O., H. Chen, et al. (2002). "Disruption of oxygen homeostasis underlies congenital Chuvash polycythemia." Nat Genet **32**(4): 614-21.
- Arthur, W. T., L. A. Petch, et al. (2000). "Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism." Curr Biol **10**(12): 719-22.
- Barbera, M. J., I. Puig, et al. (2004). "Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells." Oncogene **23**(44): 7345-54.
- Barry, R. E. and W. Krek (2004). "The von Hippel-Lindau tumour suppressor: a multifaceted inhibitor of tumourigenesis." Trends Mol Med **10**(9): 466-72.
- Batlle, E., E. Sancho, et al. (2000). "The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells." Nat Cell Biol **2**(2): 84-9.
- Bindra, R. S., J. R. Vasselli, et al. (2002). "VHL-mediated hypoxia regulation of cyclin D1 in renal carcinoma cells." Cancer Res **62**(11): 3014-9.
- Bishop, T., K. W. Lau, et al. (2004). "Genetic analysis of pathways regulated by the von hippel-lindau tumor suppressor in *Caenorhabditis elegans*." PLoS Biol **2**(10): e289.
- Bluyssen, H. A., M. P. Lolkema, et al. (2004). "Fibronectin is a hypoxia-independent target of the tumor suppressor VHL." FEBS Lett **556**(1-3): 137-42.
- Brugarolas, J. B., F. Vazquez, et al. (2003). "TSC2 regulates VEGF through mTOR-dependent and -independent pathways." Cancer Cell **4**(2): 147-58.
- Bruick, R. K. and S. L. McKnight (2001). "A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF." Science **294**(5545): 1337-40.
- Cali, G., C. Mazzearella, et al. (1999). "RhoA activity is required for fibronectin assembly and counteracts beta1B integrin inhibitory effect in FRT epithelial cells." J Cell Sci **112**(Pt 6): 957-65.
- Calzada, M. J., M. A. Esteban, et al. (2006). "von Hippel-Lindau tumor suppressor protein regulates the assembly of intercellular junctions in renal cancer cells through hypoxia-inducible factor-independent mechanisms." Cancer Res **66**(3): 1553-60.
- Cano, A., M. A. Perez-Moreno, et al. (2000). "The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression." Nat Cell Biol **2**(2): 76-83.

- Clifford, S. C., M. E. Cockman, et al. (2001). "Contrasting effects on HIF-1alpha regulation by disease-causing pVHL mutations correlate with patterns of tumourigenesis in von Hippel-Lindau disease." Hum Mol Genet **10**(10): 1029-38.
- Cockman, M. E., N. Masson, et al. (2000). "Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein." J Biol Chem **275**(33): 25733-41.
- Conacci-Sorrell, M., J. Zhurinsky, et al. (2002). "The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer." J Clin Invest **109**(8): 987-91.
- Danen, E. H., P. Sonneveld, et al. (2002). "The fibronectin-binding integrins alpha5beta1 and alphavbeta3 differentially modulate RhoA-GTP loading, organization of cell matrix adhesions, and fibronectin fibrillogenesis." J Cell Biol **159**(6): 1071-86.
- Davidowitz, E. J., A. R. Schoenfeld, et al. (2001). "VHL induces renal cell differentiation and growth arrest through integration of cell-cell and cell-extracellular matrix signaling." Mol Cell Biol **21**(3): 865-74.
- del Peso, L., M. C. Castellanos, et al. (2003). "The von Hippel Lindau/hypoxia-inducible factor (HIF) pathway regulates the transcription of the HIF-proline hydroxylase genes in response to low oxygen." J Biol Chem **278**(49): 48690-5.
- Esteban-Barragan, M. A., P. Avila, et al. (2002). "Role of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in the formation of beta1-integrin fibrillar adhesions." Cancer Res **62**(10): 2929-36.
- Esteban, M. A., S. K. Harten, et al. (2006). "Formation of primary cilia in the renal epithelium is regulated by the von hippel-lindau tumor suppressor protein." J Am Soc Nephrol **17**(7): 1801-6.
- Esteban, M. A., M. G. Tran, et al. (2006). "Regulation of E-cadherin expression by VHL and hypoxia-inducible factor." Cancer Res **66**(7): 3567-75.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2002). "Rho GTPases in cell biology." Nature **420**(6916): 629-35.
- Evans, A. J., R. C. Russell, et al. (2007). "VHL promotes E2 box-dependent E-cadherin transcription by HIF-mediated regulation of SIP1 and snail." Mol Cell Biol **27**(1): 157-69. Epub 2006 Oct 23.
- Fukata, M., M. Nakagawa, et al. (2003). "Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration." Curr Opin Cell Biol **15**(5): 590-7.



- George, E. L., H. S. Baldwin, et al. (1997). "Fibronectins are essential for heart and blood vessel morphogenesis but are dispensable for initial specification of precursor cells." Blood **90**(8): 3073-81.
- Gnarra, J. R., D. R. Duan, et al. (1996). "Molecular cloning of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and its role in renal carcinoma." Biochim Biophys Acta **1242**(3): 201-10.
- Gnarra, J. R., J. M. Ward, et al. (1997). "Defective placental vasculogenesis causes embryonic lethality in VHL-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A. **94**(17): 9102-7.
- Gordan, J. D., J. A. Bertout, et al. (2007). "HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity." Cancer Cell **11**(4): 335-47.
- Grevengoed, E. E. and M. Peifer (2003). "Cytoskeletal connections: building strong cells in new ways." Curr Biol **13**(14): R568-70.
- Grosfeld, A., I. P. Stolze, et al. (2007). "Interaction of hydroxylated collagen IV with the von hippel-lindau tumor suppressor." J Biol Chem. **282**(18): 13264-9. Epub 2007 Mar 5.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Harrington, E. O., C. J. Shannon, et al. (2005). "PKCdelta regulates endothelial basal barrier function through modulation of RhoA GTPase activity." Exp Cell Res. **308**(2): 407-21.
- Harten, S. K., D. Shukla, et al. (2009). "Regulation of renal epithelial tight junctions by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene involves occludin and claudin 1 and is independent of E-cadherin." Mol Biol Cell **20**(3): 1089-101.
- He, Z., S. Liu, et al. (2004). "Expression of fibronectin and HIF-1alpha in renal cell carcinomas: relationship to von Hippel-Lindau gene inactivation." Cancer Genet Cytogenet. **152**(2): 89-94.
- Helczynska, K., A. Kronblad, et al. (2003). "Hypoxia promotes a dedifferentiated phenotype in ductal breast carcinoma in situ." Cancer Res **63**(7): 1441-4.
- Hergovich, A., J. Lisztwan, et al. (2003). "Regulation of microtubule stability by the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein pVHL." Nat Cell Biol **5**(1): 64-70.
- Hoffman, M. A., M. Ohh, et al. (2001). "von Hippel-Lindau protein mutants linked to type 2C VHL disease preserve the ability to downregulate HIF." Hum Mol Genet **10**(10): 1019-27.

- Holinstat, M., D. Mehta, et al. (2003). "Protein kinase Calpha-induced p115RhoGEF phosphorylation signals endothelial cytoskeletal rearrangement." J Biol Chem. **278**(31): 28793-8.
- Hsu, T., Y. Adereth, et al. (2006). "Endocytic function of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein regulates surface localization of fibroblast growth factor receptor 1 and cell motility." J Biol Chem. **281**(17): 12069-80.
- Hu, C. J., L. Y. Wang, et al. (2003). "Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation." Mol Cell Biol **23**(24): 9361-74.
- Hynes, R. O. (1992). "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion." Cell. **69**(1): 11-25.
- Iliopoulos, O., A. Kibel, et al. (1995). "Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product." Nat Med **1**(8): 822-6.
- Iturrioz, X., J. Durgan, et al. (2006). "The von Hippel-Lindau tumour-suppressor protein interaction with protein kinase Cdelta." Biochem J. **397**(1): 109-20.
- Jaakkola, P., D. R. Mole, et al. (2001). "Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation." Science. **292**(5516): 468-72.
- Jiang, Y., W. Zhang, et al. (2003). "Gene expression profiling in a renal cell carcinoma cell line: dissecting VHL and hypoxia-dependent pathways." Mol Cancer Res. **1**(6): 453-62.
- Jogi, A., I. Ora, et al. (2002). "Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(10): 7021-6.
- Kaelin, W. G., Jr. (2002). "Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome." Nat Rev Cancer **2**(9): 673-82.
- Kamada, M., K. Suzuki, et al. (2001). "von Hippel-Lindau protein promotes the assembly of actin and vinculin and inhibits cell motility." Cancer Res **61**(10): 4184-9.
- Kim, M., Y. Yan, et al. (2004). "Ectopic expression of von Hippel-Lindau tumor suppressor induces apoptosis in 786-O renal cell carcinoma cells and regresses tumor growth of 786-O cells in nude mouse." Biochem Biophys Res Commun. **320**(3): 945-50.

- Kondo, K., W. Y. Kim, et al. (2003). "Inhibition of HIF2alpha is sufficient to suppress pVHL-defective tumor growth." PLoS Biol **1**(3): E83.
- Kondo, K., J. Klco, et al. (2002). "Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein." Cancer Cell **1**(3): 237-46.
- Koochekpour, S., M. Jeffers, et al. (1999). "The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene inhibits hepatocyte growth factor/scatter factor-induced invasion and branching morphogenesis in renal carcinoma cells." Mol Cell Biol **19**(9): 5902-12.
- Krishnamachary, B., D. Zagzag, et al. (2006). "Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFH1A, and ZFH1B." Cancer Res **66**(5): 2725-31.
- Kurban, G., E. Duplan, et al. (2007). "Collagen matrix assembly is driven by the interaction of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein with hydroxylated collagen IV alpha 2." Oncogene **13**: 13.
- Kurban, G., V. Hudon, et al. (2006). "Characterization of a von Hippel Lindau pathway involved in extracellular matrix remodeling, cell invasion, and angiogenesis." Cancer Res. **66**(3): 1313-9.
- Lewis, M. D. and B. J. Roberts (2003). "Role of nuclear and cytoplasmic localization in the tumour-suppressor activity of the von Hippel-Lindau protein." Oncogene **22**(26): 3992-7.
- Li, X. and B. Lim (2003). "RhoGTPases and their role in cancer." Oncol Res. **13**(6-10): 323-31.
- Lieubeau-Teillet, B., J. Rak, et al. (1998). "von Hippel-Lindau gene-mediated growth suppression and induction of differentiation in renal cell carcinoma cells grown as multicellular tumor spheroids." Cancer Res **58**(21): 4957-62.
- Lolkema, M. P., M. L. Gervais, et al. (2005). "Tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein requires phosphorylation of the acidic domain." J Biol Chem **11**: 11.
- Lolkema, M. P., D. A. Mans, et al. (2007). "The von Hippel-Lindau tumour suppressor interacts with microtubules through kinesin-2." FEBS Lett. **581**(24): 4571-6. Epub 2007 Aug 31.
- Lolkema, M. P., D. A. Mans, et al. (2007). "Allele-specific regulation of primary cilia function by the von Hippel-Lindau tumor suppressor." Eur J Hum Genet **3**: 3.

- Lolkema, M. P., N. Mehra, et al. (2004). "The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein influences microtubule dynamics at the cell periphery." Exp Cell Res **301**(2): 139-46.
- Mack, F. A., W. K. Rathmell, et al. (2003). "Loss of pVHL is sufficient to cause HIF dysregulation in primary cells but does not promote tumor growth." Cancer Cell **3**(1): 75-88.
- Maher, E. R. and W. G. Kaelin, Jr. (1997). "von Hippel-Lindau disease." Medicine (Baltimore). **76**(6): 381-91.
- Mandriota, S. J., K. J. Turner, et al. (2002). "HIF activation identifies early lesions in VHL kidneys: evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron." Cancer Cell **1**(5): 459-68.
- Maranchie, J. K., J. R. Vasselli, et al. (2002). "The contribution of VHL substrate binding and HIF1- $\alpha$  to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma." Cancer Cell **1**(3): 247-55.
- Masson, N., C. Willam, et al. (2001). "Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- $\alpha$  chains activated by prolyl hydroxylation." Embo J **20**(18): 5197-206.
- Matias-Roman, S., B. G. Galvez, et al. (2005). "Membrane type 1-matrix metalloproteinase is involved in migration of human monocytes and is regulated through their interaction with fibronectin or endothelium." Blood **105**(10): 3956-64.
- Matter, K. and M. S. Balda (2003). "Functional analysis of tight junctions." Methods **30**(3): 228-34.
- Matter, K. and M. S. Balda (2003). "Signalling to and from tight junctions." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(3): 225-36.
- Maxwell, P. H., M. S. Wiesener, et al. (1999). "The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis." Nature **399**(6733): 271-5.
- Mehta, D., A. Rahman, et al. (2001). "Protein kinase C- $\alpha$  signals rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor phosphorylation and rho activation and regulates the endothelial cell barrier function." J Biol Chem. **276**(25): 22614-20.
- Moyano, J. V., A. Maqueda, et al. (2003). "Alpha4beta1 integrin/ligand interaction inhibits alpha5beta1-induced stress fibers and focal adhesions via down-regulation of RhoA and induces melanoma cell migration." Mol Biol Cell. **14**(9): 3699-715.

- Mullin, J. M. (2004). "Epithelial barriers, compartmentation, and cancer." Sci STKE **2004**(216): pe2.
- Ohh, M., R. L. Yauch, et al. (1998). "The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix." Mol Cell **1**(7): 959-68.
- Okuda, H., S. Hirai, et al. (1999). "Direct interaction of the beta-domain of VHL tumor suppressor protein with the regulatory domain of atypical PKC isoforms." Biochem Biophys Res Commun **263**(2): 491-7.
- Okuda, H., K. Saitoh, et al. (2001). "The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein mediates ubiquitination of activated atypical protein kinase C." J Biol Chem **276**(47): 43611-7.
- Pal, S., K. P. Claffey, et al. (1997). "The von Hippel-Lindau gene product inhibits vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor expression in renal cell carcinoma by blocking protein kinase C pathways." J Biol Chem **272**(44): 27509-12.
- Pang, H. and K. N. Bitar (2005). "Direct association of RhoA with specific domains of PKC- $\alpha$ ." Am J Physiol Cell Physiol **289**(4): C982-93.
- Pankov, R., E. Cukierman, et al. (2000). "Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of  $\alpha$ (5) $\beta$ (1) integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis." J Cell Biol **148**(5): 1075-90.
- Pankov, R. and K. M. Yamada (2002). "Fibronectin at a glance." J Cell Sci **115**(Pt 20): 3861-3.
- Petrella, B. L. and C. E. Brinckerhoff (2006). "Tumor cell invasion of von Hippel Lindau renal cell carcinoma cells is mediated by membrane type-1 matrix metalloproteinase." Mol Cancer **5**: 66.
- Petrella, B. L., J. Lohi, et al. (2005). "Identification of membrane type-1 matrix metalloproteinase as a target of hypoxia-inducible factor-2  $\alpha$  in von Hippel-Lindau renal cell carcinoma." Oncogene **24**(6): 1043-52.
- Ridley, A. J. (2001). "Rho family proteins: coordinating cell responses." Trends Cell Biol **11**(12): 471-7.
- Robinson, E. E., R. A. Foty, et al. (2004). "Fibronectin matrix assembly regulates  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-mediated cell cohesion." Mol Biol Cell **15**(3): 973-81.

- Roe, J. S., H. Kim, et al. (2006). "p53 stabilization and transactivation by a von Hippel-Lindau protein." Mol Cell **22**(3): 395-405.
- Schoenfeld, A., E. J. Davidowitz, et al. (1998). "A second major native von Hippel-Lindau gene product, initiated from an internal translation start site, functions as a tumor suppressor." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(15): 8817-22.
- Schwarzbauer, J. E. and J. L. Sechler (1999). "Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly." Curr Opin Cell Biol **11**(5): 622-7.
- Semenza, G. L. (2003). "Targeting HIF-1 for cancer therapy." Nat Rev Cancer **3**(10): 721-32.
- Shaub, A. (1999). "Unravelling the extracellular matrix." Nat Cell Biol **1**(7): E173-5.
- Sottile, J. and D. C. Hocking (2002). "Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions." Mol Biol Cell **13**(10): 3546-59.
- Stickle, N. H., J. Chung, et al. (2004). "pVHL modification by NEDD8 is required for fibronectin matrix assembly and suppression of tumor development." Mol Cell Biol **24**(8): 3251-61.
- Struckmann, K., K. Mertz, et al. (2008). "pVHL co-ordinately regulates CXCR4/CXCL12 and MMP2/MMP9 expression in human clear-cell renal cell carcinoma." J Pathol **214**(4): 464-71.
- Tang, N., F. Mack, et al. (2006). "pVHL function is essential for endothelial extracellular matrix deposition." Mol Cell Biol **26**(7): 2519-30.
- Tanimoto, K., Y. Makino, et al. (2000). "Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein." Embo J **19**(16): 4298-309.
- Thiery, J. P. (2002). "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." Nat Rev Cancer **2**(6): 442-54.
- Tsukita, S., M. Furuse, et al. (2001). "Multifunctional strands in tight junctions." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(4): 285-93.
- Wierzbicka-Patynowski, I. and J. E. Schwarzbauer (2003). "The ins and outs of fibronectin matrix assembly." J Cell Sci **116**(Pt 16): 3269-76.
- Yang, H., Y. A. Minamishima, et al. (2007). "pVHL Acts as an Adaptor to Promote the Inhibitory Phosphorylation of the NF-kappaB Agonist Card9 by CK2." Mol Cell **28**(1): 15-27.

- Zajaczkowski, M. B., E. Cukierman, et al. (2003). "Cell-matrix adhesions on poly(vinyl alcohol) hydrogels." Tissue Eng **9**(3): 525-33.
- Zamir, E., B. Z. Katz, et al. (1999). "Molecular diversity of cell-matrix adhesions." J Cell Sci **112 ( Pt 11)**: 1655-69.
- Zhang, Q., M. K. Magnusson, et al. (1997). "Lysophosphatidic acid and microtubule-destabilizing agents stimulate fibronectin matrix assembly through Rho-dependent actin stress fiber formation and cell contraction." Mol Biol Cell **8**(8): 1415-25.
- Zhong, C., M. Chrzanowska-Wodnicka, et al. (1998). "Rho-mediated contractility exposes a cryptic site in fibronectin and induces fibronectin matrix assembly." J Cell Biol. **141**(2): 539-51.
- Zimmer, M., D. Doucette, et al. (2004). "Inhibition of hypoxia-inducible factor is sufficient for growth suppression of VHL-/- tumors." Mol Cancer Res **2**(2): 89-95.





***ANEXO I***



El trabajo presentado en esta tesis doctoral se haya fundamentalmente descrito en los siguientes artículos:

- **Feijóo-Cuaresma M**, Méndez F, Maqueda A, Esteban MA, Naranjo-Suarez S, Castellanos MC, del Cerro MH, Vazquez SN, García-Pardo A, Landázuri MO, Calzada MJ. “Inadequate activation of the GTPase RhoA contributes to the lack of fibronectin matrix assembly in von Hippel-Lindau protein-defective renal cancer cells.” J Biol Chem. 2008 Sep 5;283(36):24982-90.
- Calzada MJ, Esteban MA, **Feijóo-Cuaresma M**, Castellanos MC, Naranjo-Suárez S, Temes E, Méndez F, Yáñez-Mo M, Ohh M, Landázuri MO. “von Hippel-Lindau tumor suppressor protein regulates the assembly of intercellular junctions in renal cancer cells through hypoxia-inducible factor-independent mechanisms.” Cancer Res. 2006 Feb 1;66(3):1553-60.

Durante este periodo de formación el doctorando ha participado en las siguientes contribuciones científicas:

- Temes E, Martín-Puig S, Acosta-Iborra B, Castellanos MC, **Feijoo-Cuaresma M**, Olmos G, Aragón J, Landazuri MO. “Activation of HIF-prolyl hydroxylases by R59949, an inhibitor of the diacylglycerol kinase.” J Biol Chem. 2005 Jun 24;280(25):24238-44.
- Sanz L, **Feijóo M**, Blanco B, Serrano A, Alvarez-Vallina L. “Generation of non-permissive basement membranes by anti-laminin antibody fragments produced by matrix-embedded gene-modified cells.” Cancer Immunol Immunother. 2003 Oct;52(10):643-7.
- Sanz L, García-Bermejo L, Blanco FJ, Kristensen P, **Feijóo M**, Suárez E, Blanco B, Alvarez-Vallina L. “A novel cell binding site in the coiled-coil domain of laminin involved in capillary morphogenesis.” EMBO J. 2003 Apr 1;22(7):1508-17.



## ***ANEXO II***